

Epimutationen humaner Keimzellen und Infertilität



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Juliane Kutzt

geboren in

Magdeburg

Würzburg, Januar 2015

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ricardo Benavente

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung und eidesstattliche Versicherung

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Oktober 2010 bis Dezember 2014 am Institut für Humangenetik der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg erstellt, unter Betreuung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf.

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur unter Verwendung der hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel sowie ohne die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung erstellt habe. Die für die hier vorgelegte Arbeit herangezogenen Quellen sind alle als solche gekennzeichnet und vollständig angegeben.

Des Weiteren versichere ich an Eides statt, dass mir die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt wurde und dass keine Person oder Organisation eingeschaltet war, die gegen Entgelt Betreuer/-innen für Dissertationsanfertigungen sucht.

Außerdem versichere ich, dass die Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Würzburg eingehalten wurden.

Des Weiteren erkläre ich, dass die hier vorliegende Arbeit nicht bereits in gleicher oder ähnlicher Art in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Die Diplomprüfung im Fach Biologie wurde von mir am 11. Dezember 2008 bestanden. Am 15. Januar 2009 wurde mir dann von der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg der akademische Grad der „Diplom-Biologin Univ.“ verliehen. Zunächst wurde ab April 2009 eine Promotion in der Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Thomas Brand angestrebt. Diese wurde für 1 Semester am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg und für ein weiteres Jahr am Harefield Heart Science Centre / Imperial College London durchgeführt. Aus persönlichen Gründen wurde dieses Promotionsvorhaben im September 2010 von mir frühzeitig abgebrochen. Ein akademischer Grad wurde hierbei nicht erworben. Im Oktober 2010 begann ich dann ein neues Promotionsvorhaben in der Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf, welches in der hier vorgelegten Arbeit resultierte. Weitere akademische Grade wurden von mir nicht angestrebt noch erworben.

Würzburg, Januar 2015

Juliane Kutzt

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Thomas Haaf danken, für die Möglichkeit die hier vorliegende Arbeit durchführen zu können an diesem interessanten und vielschichtigen Thema. Ich bedanke mich für die Doktorandenstelle und die Betreuung in den letzten Jahren, während ich die hier vorliegende Arbeit durchgeführt habe. Außerdem möchte ich Herrn Prof. Ricardo Benavente dafür danken, dass er die Funktion des Zweitgutachters übernommen hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen Tamara Schneider, Nady El Hajj und Eberhard Schneider bedanken für den lieben Empfang in dieser Arbeitsgruppe, für ihre Tipps und aufmunternden Worte. Ich bedanke mich auch bei allen anderen Kollegen und Doktoranden der AG Haaf und der Humangenetik insgesamt, für diese schöne Zeit und ebenfalls für ihre Unterstützung, gerade auch in Zeiten in denen sich der Laborgott mal wieder gegen einen verschworen hatte und einfach nichts funktionieren wollte.

Ich möchte mich außerdem bei meiner Familie bedanken, die immer hinter mir stand, mich in allen Entscheidungen unterstützt hat und mir diesen Weg ermöglichte. Besonderer Dank gilt meiner Mutter, die schon frühzeitig mein Interesse an der Biologie, insbesondere der Genetik und Zellbiologie, geweckt hat und die damit letztlich „verantwortlich“ dafür ist, dass ich diesen spannenden Weg in die Wissenschaft eingeschlagen habe.

Natürlich möchte ich auch meinem Freund danken, der ebenfalls immer unterstützend an meiner Seite stand und mir immer viel Kraft und Selbstvertrauen gegeben hat, um Studium, Promotion und alle anderen manchmal schwierigen Lebenslagen zu meistern. Schön, dass es dich gibt!

Und natürlich möchte ich auch meinem gesamten Freundeskreis danken, für die Möglichkeiten abzuschalten und mal auf andere Gedanken zu kommen.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung und eidesstattliche Versicherung	3
Danksagung	4
Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Was ist Epigenetik?	5
1.2 DNA-Methylierung	6
1.3 Genomische Prägung	9
1.3.1 Bedeutung der genomischen Prägung	9
1.3.2 Evolutionäre Bedeutung genomischer Prägung	11
1.3.3 Eigenschaften geprägter Gene	12
1.4 Epigenetische Reprogrammierung und Imprint-Etablierung	15
1.5 Imprinting-Störungen und Syndrome	22
1.6 Epigenetische Besonderheiten des Spermien-genoms	24
1.7 Infertilität und assistierte reproduktive Technologien (ART)	26
1.7.1 Ursachen männlicher Infertilität	27
1.7.2 Ursachen weiblicher Infertilität	30
1.7.3 Intracytoplasmatische morphologisch selektierte Spermieninjektion (IMSI)	33
1.8 ART und Imprinting	34
1.9 Vorstellung der in dieser Arbeit untersuchten Gene	38
1.9.1 <i>hGTL2</i>	38
1.9.2 <i>hPEG3</i>	40
1.9.3 <i>hLIT1</i>	41
1.9.4 <i>hSNRPN</i>	42
1.9.5 Pluripotenzgene <i>hNANOG</i> und <i>hOCT4</i>	43
1.9.6 <i>hDNMT3Lo</i>	44
1.10 Ziele dieser Arbeit	46
2 Material und Methoden	48
2.1 Materialien	48
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	48
2.1.2 Kits	48
2.1.3 Reagenzien	49

2.1.4	Chemikalien	49
2.1.5	Geräte.....	50
2.1.6	Software	51
2.2	Puffer und Lösungen.....	52
2.3	Primer	53
2.4	Biologisches Material	60
2.4.1	Spermienproben	60
2.4.2	Oocytenproben.....	63
2.5	Methoden	66
2.5.1	Aufreinigung und DNA-Isolation aus Spermien	66
2.5.2	Bisulfitkonvertierung	68
2.5.3	Limiting Dilution.....	70
2.5.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	72
2.5.5	Gelelektrophorese	77
2.5.6	Librarypräparation für Deep Bisulfite Sequencing.....	78
2.5.7	Pyrosequenzierung.....	81
2.5.8	Deep Bisulfite Sequencing	83
2.5.9	Datenanalyse.....	90
3	Ergebnisse.....	93
3.1	Untersuchungen zum Einfluss verschiedener ART-Prozeduren auf das humane Epigenom.....	94
3.1.1	DNA-Methylierungsmusteranalysen geprägter Gene in IMSI-selektierten Spermien und Untersuchungen zum potentiellen Einfluss von Spermienkopfvakuolen auf die DNA-Methylierung	94
3.1.2	Untersuchungen zur DNA-Methylierung verschiedener geprägter und nicht geprägter Gene in humanen Einzeloocyten und der potentiellen Beeinflussung dieser durch IVM.....	103
3.2	Untersuchungen zur Häufigkeit von Epimutationen in humanen Spermien unterschiedlicher Qualität und zum potentiellen Einfluss dieser Epimutationen auf den ART-Erfolg	126
4	Diskussion.....	145
4.1	DNA-Methylierung geprägter Gene in IMSI-selektierten Spermien und der Einfluss von Spermienkopfvakuolen.....	148
4.2	Einfluss von IVM auf die Imprint-Etablierung in humanen Oocyten	151
4.3	Deep Bisulfite Sequenzierung normaler und OAT-Spermien mit Hinblick auf den ART-Ausgang.....	157
4.4	Ausblick	162

5	Referenzen	164
5.1	Literaturnachweis.....	164
5.2	Weitere elektronische Quellen.....	173
6	Verzeichnisse	174
6.1	Abkürzungsverzeichnis	174
6.2	Maßeinheiten.....	178
6.3	Abbildungsverzeichnis	179
6.4	Tabellenverzeichnis.....	179
7	Curriculum vitae	182
8	Publikationen und Kongressbeiträge.....	183
8.1	Publikationen	183
8.2	Kongressbeiträge.....	184

Zusammenfassung

Infertilität stellt in unserer heutigen Gesellschaft ein zunehmendes Problem dar. Bei der Suche nach den der Infertilität zugrunde liegenden Ursachen gerät immer mehr die Epigenetik in den Fokus. Epigenetische Prozesse sind nicht nur in die Embryonalentwicklung und Wachstumsprozesse des Kindes involviert, sondern auch in korrekte Funktionsweisen von Gameten. Störungen können die Fertilität beeinträchtigen. Eine besondere Rolle spielen geprägte Gene, die auf einem ihrer Allele, je nach parentaler Herkunft, ein Imprint in Form von DNA-Methylierung tragen. Fehlregulationen solcher geprägter Gene können zu Imprinting-Erkrankungen führen.

Seit Einführung der *In-vitro*-Fertilisation (IVF) wurden verschiedene assistierte Reproduktionstechniken (ART) entwickelt, um infertilen Paaren zu helfen. Die Sicherheit dieser Techniken ist nicht abschließend geklärt. Immer wieder wird von nach ART-Behandlung gehäuft auftretenden Imprinting-Erkrankungen berichtet. Diese Erkrankungen stehen jedoch eher in Zusammenhang mit der zugrunde liegenden Infertilität, als mit ART selbst. Dennoch ist es notwendig zu untersuchen inwieweit sich ART eventuell auf den Gesundheitszustand dieser Kinder auswirken könnte.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Zusammenhang von Epigenetik, Infertilität und ART von verschiedenen Standpunkten aus beleuchtet.

In humanen Spermien wurde die DNA-Methylierung verschiedener geprägter Gene hinsichtlich Epimutationen untersucht. ICSI (intracytoplasmatic sperm injection) und IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) sind verschiedene Techniken zur Selektion von Spermien für eine ART-Behandlung. Hier wurde untersucht, ob IMSI epigenetisch bessere Spermien selektiert als die konventionelle ICSI-Methode. Außerdem ist bekannt, dass in Spermienköpfen fertiler und infertiler Männer Vakuolen vorkommen können, deren epigenetische Bedeutung jedoch unbekannt ist. Ob diese Vakuolen in Zusammenhang mit Epimutationen stehen könnten, wurde ebenfalls überprüft. Dazu wurde bisulfidkonvertierte DNA weniger Spermien (11 je Probe) mithilfe der Limiting Dilution (LD)-Technik und Pyrosequenzierung analysiert. Insgesamt standen 880 Spermien für diese Untersuchung zur Verfügung. Es konnte kein Unterschied zwischen IMSI- und ICSI-selektierten Spermien gefunden

werden. Vorhandene Vakuolen im Spermienkopf beeinträchtigten nicht die DNA-Methylierung der Gene *hGTL2*, *hLIT1* und *hPEG3*.

Ein weiteres Projekt befasste sich mit der Frage, inwieweit die Technik der *In-vitro*-Maturation (IVM) DNA-Methylierung in humanen Oocyten beeinflussen könnte. Bisulfitkonvertierte DNA einzelner humaner Oocyten wurde mit LD und Pyrosequenzierung analysiert. Verglichen wurden IVM und *in vivo* gereifte Oocyten. Hierfür standen 139 Oocyten zur Verfügung, wovon 90 mittels IVM und 49 *in vivo* gereift waren. Untersucht wurden vier geprägte Gene (*hGTL2*, *hLIT1*, *hPEG3* und *hSNRPN*) und drei nicht geprägte Gene (*hDNMT3Lo*, *hNANOG* und *hOCT4*). Es konnten keine IVM-bedingten Epimutationen gefunden werden.

Im dritten Projekt wurde untersucht, ob sich die DNA-Methylierung normaler Spermien von Spermien aus Oligozoospermie-Asthenozoospermie-Teratozoospermie (OAT)–Syndrom-Patienten unterscheidet. Eine weitere Frage war, ob Epimutationen einen Einfluss auf den ART-Ausgang haben. Untersucht wurden 54 Spermienproben von Paaren in ART-Behandlung. Zur Untersuchung der DNA-Methylierungsmuster der geprägten Gene *hGTL2* und *hPEG3* sowie der beiden nicht geprägten Pluripotenzgene *hNANOG* und *hOCT4* wurde die Methode Deep Bisulfite Sequencing (DBS) verwendet. Dies ist eine Next Generation Sequencing (NGS)–Technik, angewandt an bisulfitkonvertierter DNA. Diese Technik ermöglicht es mehrere Proben sowie Gene gleichzeitig zu analysieren. Es zeigte sich, dass OAT-Spermien, die zu einer Lebendgeburt geführt hatten, sich epigenetisch nicht von normalen Spermien unterschieden. Besonders viele Epimutationen konnten hingegen in OAT-Spermien gefunden werden, die zu keiner Schwangerschaft geführt hatten. Zwischen Spermien die zu einer Lebendgeburt oder keiner Schwangerschaft geführt hatten, zeigten sich Unterschiede in der Häufigkeit von *hGTL2*-Epimutationen. Über die Häufigkeit von Epimutationen konnte eine prädiktive Aussage zum ART-Ausgang getroffen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass sich eine Häufung von Epimutationen darauf auswirkt, ob eine Schwangerschaft erreicht werden kann oder nicht. Diese Epimutationen liegen bereits im parentalen Genom vor. Sie werden nicht durch ART verursacht. Allerdings muss man Techniken finden, mit denen man Gameten mit möglichst wenig Epimutationen selektiert, um eine Übertragung solcher auf das Kind zu verhindern.

Summary

Infertility is an increasing problem in today's society. The search for the underlying causes of infertility reveals more and more the role of epigenetics. Epigenetic processes are involved in embryo development and growth, but also in the proper function of gametes. Disturbances have been shown to impair fertility. Imprinted genes play an important role. They carry a parental-specific DNA methylation imprint on one of their alleles. Deregulation of these genes leads to imprinting diseases.

Since the introduction of *in vitro* fertilisation (IVF), different assisted reproductive technologies (ART) have been developed to treat infertile couples. The safety of these techniques is not finally solved. Increased rates of imprinting diseases in ART offspring have been reported, but seem more likely to be linked to the underlying parental infertility problems than to ART itself. Nevertheless it is of importance to investigate how ART could affect the health of those children.

In the work presented here the relations between epigenetics, infertility and ART have been investigated from different points of view.

Firstly, the DNA methylation pattern of different imprinted genes has been investigated in human sperm with regard to the frequency of epimutations. ICSI (intracytoplasmic sperm injection) and IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) are different techniques to select sperm for ART treatment. It was analysed whether IMSI selects epigenetically superior sperm than the conventional ICSI method. Furthermore it is known that sperm from fertile and infertile men can carry vacuoles in their sperm heads. Their epigenetic relevance is unknown. Whether these vacuoles are linked to epimutations has also been investigated here. Bisulfite converted DNA of a few sperm (11 per sample) was analysed using the Limiting Dilution (LD) technique followed by pyrosequencing. In total 880 sperm were available for analysis. No difference between IMSI and ICSI selected sperm was found. Further, no influence of sperm head vacuoles on the DNA methylation patterns of the genes *hGTL2*, *hLIT1* and *hPEG3* could be observed.

Secondly, it was of interest whether the *in vitro* maturation (IVM) technique has an influence on DNA methylation in human oocytes. Bisulfite converted DNA of single human oocytes was analysed with LD and pyrosequencing. IVM oocytes were com-

pared to *in vivo* grown oocytes. A total of 139 oocytes were available, of which 90 oocytes were IVM treated while 49 oocytes were grown *in vivo*. Four imprinted genes (*hGTL2*, *hLIT1*, *hPEG3* and *hSNRPN*) and three non-imprinted genes (*hDNMT3Lo*, *hNANOG* and *hOCT4*) were analysed. No IVM-induced epimutations were detected.

Finally, it was investigated whether DNA methylation patterns of normal sperm would differ from sperm of oligozoospermia-asthenozoospermia-teratozoospermia (OAT) syndrome patients. Furthermore it was of interest whether epimutations would influence the ART outcome. A total of 54 sperm samples from couples undergoing ART treatment were investigated. To analyse DNA methylation of the imprinted genes *hGTL2* and *hPEG3* as well as the non-imprinted pluripotency genes *hNANOG* and *hOCT4*, Deep Bisulfite Sequencing (DBS) was applied. This is a Next Generation Sequencing (NGS) technique applied on bisulfite converted DNA, allowing the analysis of several samples and genes at once. The obtained results showed that OAT samples, which had led to a live-birth, did not differ epigenetically from normal sperm. Much more epimutations were found in OAT sperm which had failed to achieve a pregnancy. Sperm not being able to achieve a pregnancy differed from sperm that had led to a live-birth with regard to *hGTL2* epimutation frequency. In addition, ART outcome can be predicted using the frequency of epimutations.

Taken together this work shows that the amount of epimutations influences whether a pregnancy can be achieved or not. Epimutations already exist within the parental genome. They are not caused by ART. Nevertheless, one needs to find techniques with which gametes with as few as possible epimutations are being selected to prevent the transmission of these onto the offspring.

1 Einleitung

1.1 Was ist Epigenetik?

Epigenetik bezeichnet alle Änderungen der Genexpression. Diese Veränderungen sind erblich, aber reversibel, da sie durch Mechanismen erfolgen, die nicht die DNA-Sequenz selbst verändern [1-3]. Epigenetische Mechanismen beeinflussen Entwicklungsprozesse, spielen eine Rolle in der Krebsbiologie, vermitteln Umwelteffekte und haben Einfluss auf Alterungsprozesse [3].

Diese epigenetischen Veränderungen können über verschiedene Mechanismen erfolgen wie

- DNA-Modifikation
- Posttranslationelle Modifikationen der Histonschwänze
- Lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs)
- Chromosomale Reorganisation

Zu den DNA-Modifikationen gehören Methylierung und Hydroxymethylierung von Cytosin im CpG-Dinukleotid-Kontext [2, 4]. Lange ncRNAs können die Chromatinstruktur regulieren [2]. Zu den Histonmodifikationen zählen Acetylierung, Methylierung, Citrullinierung, Ubiquitylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung und Biotinylierung [2, 4, 5]. Die Bedeutung der letzten drei Modifikationen ist allerdings bisher unbekannt [2]. Indem die Histonschwänze modifiziert werden, werden ihre Interaktionen mit der DNA und mit Nukleusproteinen verändert. Insbesondere die Histonschwänze der Histone H3 und H4 werden dabei kovalent an unterschiedlichen Aminosäureresten modifiziert [5]. Mittels dieser Modifikationen werden unterschiedliche biologische Funktionen wie Genexpression, DNA-Reparatur und Chromosomenkondensation beeinflusst [5]. Genexpression kann reguliert werden, indem über Histonmodifikationen die Chromatinstruktur verändert wird. Als Marker des Euchromatin gelten H3K4me, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3, wobei H3K9ac und H3K27ac an aktiven Enhancern zu finden sind, während H3K4me3 an aktiven Promotoren lokalisiert ist. Innerhalb der Genkörper aktiver Gene ist die Modifikation H3K36me3 zu beobachten. In reprimiertem Chromatin sowie in konstitutivem und fakultativem Heterochromatin findet man vor allem die Modifikationen H3K9me3 und H3K27me3.

H3K9me3 ist stark angereichert an centromerischer und pericentromerischer DNA, wo es zusammen mit der DNA-Methylierungsmaschinerie die Bildung höherer Heterochromatinstrukturen während der Assemblierung mitotischer Spindeln vermittelt [2].

Um diese epigenetischen Modifikationen umsetzen zu können, sind drei verschiedene Arten von Proteinen notwendig:

- Enzyme, welche diese epigenetischen Modifikationen etablieren (writers)
- Proteine, die die Modifikationen erkennen und mit ihnen interagieren (readers)
- Enzyme, die diese Modifikationen wieder entfernen (erasers) [2].

Da in dieser Arbeit ausschließlich die DNA-Methylierung unterschiedlicher Gene untersucht wurde, wird im Folgenden weniger auf die Bedeutung der Histone eingegangen, sondern vorrangig die Bedeutung der DNA-Methylierung behandelt.

1.2 DNA-Methylierung

DNA-Methylierung ist die bisher am besten untersuchte epigenetische Modifikation [6]. Die Methylierung ist eine kovalente, reversible und über Zellteilungen hinweg erbliche Modifikation [1, 2, 5]. Dazu wird mittels des Cofaktors S-Adenosylmethionin (SAM) eine Methylgruppe auf das 5'-C-Atom des Cytosins eines CpG-Dinukleotids übertragen. Diese Reaktion wird von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) vermittelt [2, 5]. Cytosinmethylierung (5mC) findet man in Säugetieren, aber auch in vielen anderen Spezies wie in Pflanzen, Pilzen und Insekten [7]. Vergleicht man verschiedene Spezies, zeigen sich Unterschiede in der Verteilung der DNA-Methylierung innerhalb der Genome. Es gibt dabei eine Entwicklung von einer partiellen Methylierung hin zu einer globalen genomweiten Methylierung, wie sie bei Vertebraten auftritt [7]. Im Säuger genom findet man DNA-Methylierung in intergenen Regionen, kodierenden Regionen, an transposablen mobilen Elementen und Promotoren [7].

DNA-Methylierung ist für verschiedene Prozesse von Bedeutung wie

- Transkriptionelle Repression
- Suppression der Transposition von Retroelementen
- Genomische Prägung (genomic imprinting)
- X-Chromosom-Inaktivierung (XCI)
- Etablierung höherer Chromatinorganisation [2, 8, 9].

Tritt DNA-Methylierung in der Nähe von Transkriptionsstartstellen (TSS) auf, kann sie die Initiation der Transkription blockieren, während DNA-Methylierung innerhalb eines Genkörpers die Transkriptionselongation stimulieren und möglicherweise zusätzliche alternative Transkriptionsinitiationsstellen modulieren oder Splicing beeinflussen kann [7, 8]. Des Weiteren garantiert DNA-Methylierung Chromosom- und Genomstabilität, da die Expression transposabler Elemente (TEs) unterdrückt wird und die Stilllegung von Repeatregionen, z. B. an Centromeren, gerade während der Chromosomensegregation während der Mitose von Bedeutung ist [8]. Außerdem ändert DNA-Methylierung die Aktivität von Enhancern, Insulatoren und anderen regulatorischen Elementen [8]. Transkription kann über DNA-Methylierung direkt oder indirekt beeinflusst werden. Eine direkte Repression erfolgt, indem die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren unterbunden wird. Eine indirekte Inhibition erfolgt, indem Methyl-CpG-bindende Proteine (MBPs) rekrutiert werden, wodurch wiederum reprimierende Chromatin-Remodellierungsaktivitäten initiiert werden, indem Histondeacetylasen (HDACs) oder Histonmethyltransferasen (HMTs) oder andere Chromatin-remodellierende Proteine rekrutiert werden [2, 5, 7].

Methylierung wird durch DNA-Methyltransferasen katalysiert, die man in 2 Gruppen unterteilt: de novo und maintenance. DNMT1 dient der Aufrechterhaltung bereits etablierter Methylierungsmuster, indem sie nach mitotischen Zellteilungen hemimethylierte DNA-Stränge erkennt und dieses Muster auf den neu synthetisierten DNA-Strang kopiert [2, 7, 9]. Sollen neue Methylierungsmuster etabliert werden, kommen die de novo Methyltransferasen DNMT3A, DNMT3B und deren katalytisch inaktiver Cofaktor DNMT3L zum Einsatz [2, 7, 9].

Neben der Cytosinmethylierung gibt es auch die Non-CpG-Methylierung bei der Adenosin, Guanin oder Thymin methyliert werden. Am häufigsten findet man CpA-Methylierung [2, 7]. Diese Non-CpG-Methylierung wurde in pluripotenten Stammzel-

len, in Oocyten und im adulten Gehirn detektiert und geht, außer im adulten Gehirn, während der Entwicklung verloren [2, 7]. Sie wird scheinbar durch de novo DNMTs katalysiert [2]. Allerdings tritt Non-CpG-Methylierung deutlicher seltener auf als CpG-Methylierung und ihre Bedeutung ist derzeit noch unbekannt [7].

Innerhalb des Säuger-genoms kann man eine inverse Korrelation zwischen Cytosin-methylierung und CpG-Dichte beobachten. Der Großteil des Genoms ist CpG-arm, zeigt aber hohe DNA-Methylierung, während CpG-Inseln eine hohe CpG-Dichte und Hypomethylierung zeigen [7, 8]. Diese CpG-Armut innerhalb des Genoms kommt zustande, da methyliertes Cytosin spontan oder mittels enzymatischer Deaminierung zu Thymin konvertiert werden kann (C>T Transitionsmutation) [8, 10].

CpG-Inseln (CGIs) sind Regionen innerhalb des Genoms, die eine besonders hohe CpG-Dichte im Vergleich zum Rest des Genoms aufweisen [2, 8, 10, 11]. CGIs haben durchschnittlich eine Länge von 1 kb und weisen auf etwa 100 Basen jeweils 5 bis 10 CpGs auf [7, 10, 11]. Diese Regionen sind mit Promotorregionen oder TSS assoziiert und im humanen Genom zeigen 60 bis 70% aller Promotoren solche CGIs [2, 7, 8, 10-12]. CGIs sind allerdings auch intergenisch zu finden [8]. Die Mehrzahl solcher CGIs liegt hypomethyliert vor. Hypomethylierung an Promotoren sowie Methylierung innerhalb von Genkörpern korrelieren mit der Expression eines Gens [2, 10-12]. Fast alle Haushaltsgene sowie gewebespezifische und entwicklungsregulatorische Gene sind derart reguliert [11]. Nur ein kleiner Teil von CGIs erhält während der normalen Entwicklung eines Organismus eine Methylierung. CGIs sind beispielsweise in die XCI oder Imprinting involviert [10].

XCI ist ein epigenetischer Mechanismus in weiblichen Säugern, wodurch die Expression eines der beiden weiblichen X-Chromosomen reprimiert und eine Gendosis-kompensation erreicht wird, damit in beiden Geschlechtern die Expression der Gene der Geschlechtschromosomen im selben Ausmaß erfolgt [1, 5, 13]. Diese Inaktivierung wurde bisher nur in Eutheria und Beuteltieren nachgewiesen [13]. Der Prozess involviert verschiedene epigenetische Mechanismen wie die Expression der *cis*-wirkenden ncRNA *XIST* (X inactive-specific transcript), DNA-Methylierung und Histone-modifikationen [1, 5, 13].

DNA-Methylierung spielt auch eine bedeutende Rolle in der Genomstabilisierung, indem sie transposable Elemente (TEs) stilllegt. Diese TEs sind verschiedene Klas-

sen mobiler DNA-Segmente, die den Großteil der meisten eukaryotischen Genome bilden, einschließlich fast 50% des humanen Genoms [5, 14]. Aktive TEs sind hoch mutagen. Oft finden Insertionen in proteinkodierende Gene statt, aber auch Chromosomenbrüche oder illegitime Rekombinationen und Chromosomen-Rearrangements [14]. TEs können benachbarte Gene beeinflussen, indem sie Splicing und Polyadenylierungsmuster verändern oder indem sie als Enhancer oder Promotoren fungieren [14]. Um solche insertionellen Mutationen und andere Auswirkungen zu verhindern, haben sich im Genom epigenetische Verteidigungsmechanismen entwickelt, um TEs stabil stillzulegen [5, 15]. Diese Chromatin-Modifikationen zur Unterdrückung der TE-Expression beinhalten repressive Modifikationen von Histonschwänzen, DNA-Methylierung sowie Änderungen der Chromatinverpackung und dessen Kondensation [14, 15]. In der Säuger-Spermatogenese wird die de novo Methylierung dieser TEs über piRNAs und damit interagierende Proteine reguliert [5, 14, 16]. Zusätzlich sind de novo DNMTs involviert. In Oocyten ist daneben der Faktor LSH (lymphoid-specific helicase) beteiligt. In den Keimbahnen werden demzufolge multiple Verteidigungsmechanismen angewandt, die alle der Stilllegung der TEs dienen [5].

1.3 Genomische Prägung

1.3.1 Bedeutung der genomischen Prägung

Genomische Prägung (genomic imprinting) ist ein epigenetischer Mechanismus, durch den in einer diploiden Zelle eine monoallelische Expression dieser geprägten Gene erfolgt, abhängig von ihrer parentalen Herkunft (parent-of-origin Regulation) [1, 17, 18]. Dieses Prinzip ist innerhalb der Säugetiere konserviert [17, 19]. Da sich die maternale und die paternale Genkopie funktionell unterscheiden, sind für eine normale Entwicklung beide Kopien notwendig [18]. Dieser Unterschied elterlicher Genome wiederum erklärt, weshalb es in Säugetieren keine Parthenogenese geben kann [1, 4, 20, 21]. In plazentalen Säugetieren sind etwa 100 solcher geprägten Gene bekannt, in Beuteltieren jedoch weniger [22]. Viele der geprägten Gene der Maus sind auch im Menschen konserviert, ebenso wie die dazu gehörigen Regulationsmechanismen [16, 17, 23]. Genomische Prägung ist kein Mechanismus der nur der Stilllegung bestimmter Gene dient. Stattdessen kann es auf verschiedenen Ebenen der

Genregulation wirken (Promotor, Enhancer, Splice Junctions, Polyadenylierungsstellen), um so die parental-spezifischen Unterschiede der Expression zu induzieren [4].

Viele geprägte Gene sind universell geprägt, während andere eine gewebe-spezifische oder entwicklungszeitlich-spezifische Prägung aufweisen [19]. Funktionell sind sie involviert in fetales und plazentales Wachstum sowie Entwicklung und Differenzierung, aber auch in neuroregulatorische Prozesse postnatalen Verhaltens und Metabolismus [16, 17, 19, 23]. Die verschiedenen Funktionen sind in Abbildung 1-1 dargestellt. Eine angepasste Funktionsweise der Plazenta ist wichtig, da sie der Regulationspunkt zwischen maternalem und embryonalem Gewebe und die Quelle von Hormonen und Wachstumsfaktoren ist [17]. Paternal exprimierte Gene regulieren häufig Promotoren wachstumsfördernder Gene, wie z. B. *Igf2*, *Peg1*, *Peg3*, *Rasgrf1* oder *Dlk1*. Maternale Gene hingegen regulieren Wachstumsrepressoren, wie z. B. *Igfr2*, *Gnas*, *Cdkn1c*, *H19* und *Grb10* [4].

Fehlregulationen geprägter Gene können sich auch auf Hirnfunktionen auswirken, da sie eine wichtige Rolle im Verhalten und anderen neurologischen Funktionen spielen [4, 23]. Einige geprägte Gene zeigen besonders im Gehirn ein anderes Expressionsmuster als in anderen Geweben. Beispiele dafür sind *UBE3A*, *PEG3* und *NDN*. *UBE3A* wird in den meisten Geweben bi-allelisch exprimiert, zeigt im Gehirn in bestimmten neuronalen Subtypen jedoch nur maternale Expression. Maternale *UBE3A*-Defizienz ist involviert in die neuronale Entwicklungsstörungs-Imprinting-Erkrankung Angelman-Syndrom (AS). *PEG3* zeigt eine sehr starke Expression im Gehirn, welche nur vom paternalen Allel erfolgt. Es ist involviert in neuronale Apoptose und beeinflusst geschlechtsspezifisches Verhalten, Olfaktion und Pheromonprozessierung. *NDN* ist ebenfalls ein paternal exprimiertes Gen, welches in die neuronale Differenzierung und neuronales Wachstum involviert ist. Bei der Imprinting-Erkrankung Prader-Willi-Syndrom (PWS) ist neben *SNRPN* und anderen snoRNAs auch *NDN* involviert [17]. Die verschiedenen Imprinting-Erkrankungen werden an späterer Stelle näher vorgestellt.

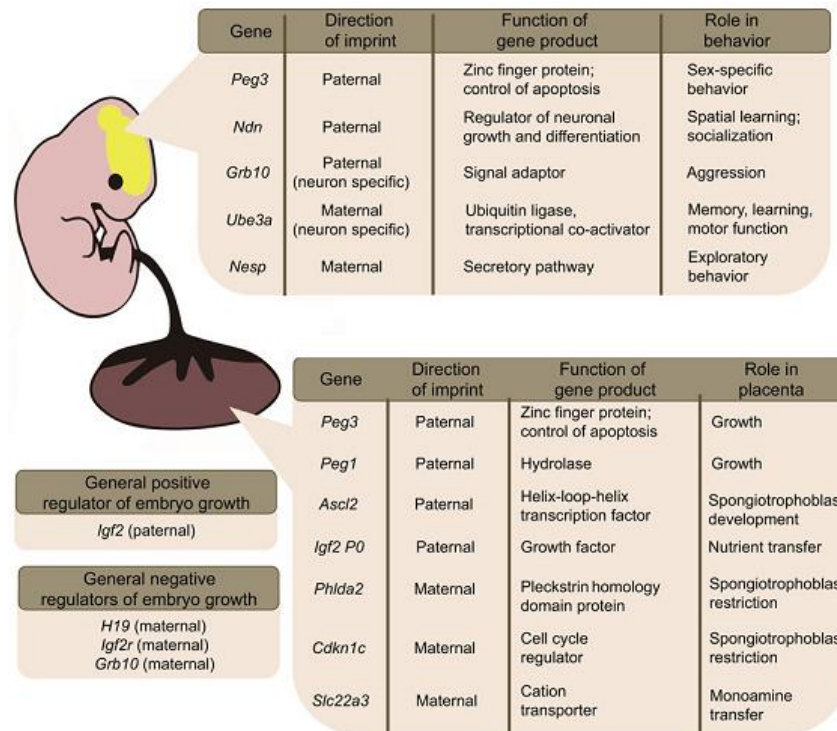


Abbildung 1-1: Funktionen geprägter Gene.

Durch Imprinting werden hauptsächlich das Wachstum des Embryos und der Plazenta reguliert, aber geprägte Gene zeigen auch Funktionen im Gehirn, wo sie postnatal Verhalten regulieren können (Abbildung aus [17]).

1.3.2 Evolutionäre Bedeutung genomischer Prägung

Genomische Prägung findet man in allen plazentalen Säugetieren (Eutheria) sowie in Beuteltieren (Metatheria) wie z. B. dem Opossum, nicht jedoch in Eier legenden Säugetieren (z. B. Schnabeltier) [4]. Imprinting entwickelte sich evolutionär in den Theria bevor sich Metatheria und Eutheria voneinander trennten [22]. Geprägte Gene haben vor allem Einfluss auf fetales Wachstum. Paternale Gene fördern Wachstum, maternale Gene hingegen begrenzen fetales und Plazenta-Wachstum [24]. Geprägte Gene kodieren für eine Vielzahl funktionell unterschiedlicher Faktoren einschließlich Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren sowie Signalproteine. Alle zusammen haben einen Einfluss auf die Kontrolle des Wachstums des Embryos [24]. Im Gegensatz zu den Eier legenden Säugetieren, hat der Embryo über die Plazenta einen direkten Einfluss darauf, wie viele Ressourcen er der Mutter für sein eigenes Wachstum entzieht. Aus der Beobachtung dieser gegensätzlichen Wirkweisen maternal und paternal geprägter Gene entwickelten Moore und Haig 1991 die parentale Konflikt-Theorie [22, 24, 25]. Das paternale und das maternale Genom verfolgen

unterschiedliche Interessen hinsichtlich der Entwicklung des Embryos. Während paternal exprimierte Gene Wachstum fördern und sicherstellen sollen, dass der Embryo maximal fit ist, wird durch maternal exprimierte Gene das fetale Wachstum eingeschränkt, damit die Mutter ihre Ressourcen möglichst gleichmäßig auf ihren Nachwuchs verteilen kann. Da der Vater nicht sicher sein kann, mit demselben Muttertier weitere Nachkommen zu zeugen, ist ihm daran gelegen, dass der bereits gezeugte Embryo besonders fit ist, um so seine Gene an die nächste Generation weiter zu geben. Aus diesem Grunde sind paternal exprimierte geprägte Gene darauf ausgelegt, den Embryo mit möglichst vielen wachstumsfördernden Stoffen zu versorgen. Beim Muttertier ist die Umkehrung der Fall. Um ihre Gene auf die folgende Generation zu streuen und dadurch evolutionär fit zu werden, muss auch sie sich mehrmals fortpflanzen, allerdings steht es ihr dabei offen verschiedene Männchen als Vater zu wählen. Damit sie in der Lage ist sich mehrmals fortzupflanzen, muss sie ihre Ressourcen einteilen, damit sich alle ihre Nachkommen gleich gut entwickeln. Deshalb wirken maternal exprimierte geprägte Gene auf das Embryowachstum reprimierend [4, 24]. Die Regulation des Ressourcentransfers zwischen Mutter und Nachkommenschaft ist auch nach der Geburt von Bedeutung, in der Phase in der die Mutter ihr Kind stillt und das Kind ihr weitere Ressourcen entzieht [24]. Dazu sind manche geprägten Gene, wie z. B. *Peg3*, in die Regulation von Brutpflege-Verhalten involviert, um sicherzustellen, dass die Nachkommenschaft angemessen versorgt ist, der Mutter dabei aber nicht zu viele Ressourcen entzogen werden [17].

Neben der parentalen Konflikt-Theorie gibt es einen weiteren Überlegungsansatz zur Entstehung von Imprinting. In den Theria-Genomen besteht etwa die Hälfte der genomischen Sequenz aus Spuren von TEs, wie Transposons und Retrotransposons. Diese TEs werden mittels DNA-Methylierung stillgelegt. Die Entstehung genomischer Prägung könnte zusätzlich auch ein Verteidigungsmechanismus gegen Fremd-DNA sein [22, 26].

1.3.3 Eigenschaften geprägter Gene

Imprints geprägter Gene müssen bestimmte Eigenschaften aufweisen, wobei DNA-Methylierung alle diese Kriterien erfüllt:

- Die epigenetischen Markierungen müssen die Transkription beeinflussen.
- Einmal etabliert, müssen sie auf demselben parentalen Chromosom verbleiben, wenn der Embryo nach der Befruchtung diploid ist.
- Imprints müssen während mitotischer Zellteilungen stabil weiter vererbt werden an die nächste Zellgeneration.
- Imprints müssen während der Reprogrammierung der Keimzellen gelöscht werden können, damit der Embryo neue, seinem eigenen Geschlecht entsprechende, Imprints etablieren kann [4, 20].

Geprägte Gene liegen häufig in Clustern von je 3 bis 12 Genen vor, allerdings gibt es auch einzeln vorliegende geprägte Gene [4]. Solche Cluster beinhalten maternal und paternal exprimierte Gene, von welchen die Mehrzahl für Proteine kodieren und wenigstens ein Gen eine lncRNA ist [4, 16]. Jedes Cluster beinhaltet außerdem eine Imprinting-Kontrollregion (ICR, auch imprint control element ICE genannt), eine kurze DNA-Sequenz die mittels ihres epigenetischen Zustandes die Expression benachbarter geprägter Gene des Clusters kontrolliert [1, 16, 17, 23]. Das Imprint, also die DNA-Methylierungsmarkierung innerhalb des ICRs, ermöglicht es dabei innerhalb einer diploiden Zelle die Herkunft der beiden parentalen Allele zu unterscheiden [1]. Je nach Methylierungszustand des ICRs können entweder von einem Allel die proteinkodierenden Gene exprimiert werden oder vom anderen Allel die regulierende ncRNA [1].

Die ICR-Imprints werden während der Gametogenese durch die de novo Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3L etabliert. Während der epigenetischen Reprogrammierung, direkt nach der Befruchtung, behalten die ICRs geprägter Gene ihre Methylierungsmuster. Während mitotischer Zellteilungen bleiben Imprints durch die maintenance DNMT1 erhalten, die die Methylierungsmuster entsprechend auf die neu synthetisierten DNA-Stränge kopiert. In den primordialen Keimzellen werden während der Gametogenese vorliegende Imprints gelöscht und neue geschlechtsspezifische Imprints etabliert [1]. Auf den genauen Ablauf der epigenetischen Reprogrammierung wird an späterer Stelle noch genauer eingegangen.

DNA-Sequenzen, die eine parental-spezifische Methylierung an ICRs zeigen, werden auch als differentiell methylierte Regionen (DMRs) bezeichnet [1, 2]. Sie sind an regulatorischen Elementen wie Promotoren oder Enhancern lokalisiert [2]. Üblicher-

weise sind DMRs mehrere kb groß [16]. Man unterscheidet zwischen primären gametischen DMRs (gDMRs), CpG-reichen Sequenzen, die ihre Methylierung während der Gametogenese erhalten, und sekundären somatischen DMRs (sDMRs), CpG-reichen Sequenzen deren Methylierung erst nach der Befruchtung in somatischen diploiden Zellen etabliert wird [1, 19, 27]. Maternal geprägte gDMRs liegen dabei innerhalb von Promotorregionen, während paternal geprägte gDMRs intergenisch lokalisiert sind, wie in Abbildung 1-2 dargestellt ist [16, 20, 23]. Die gDMRs weisen außerdem ein Ungleichgewicht auf. Bisher sind nur 4 gDMRs bekannt, die in der paternalen Keimbahn methyliert werden, während alle anderen gDMRs ihre Methylierung in der maternalen Keimbahn erhalten [16, 20].

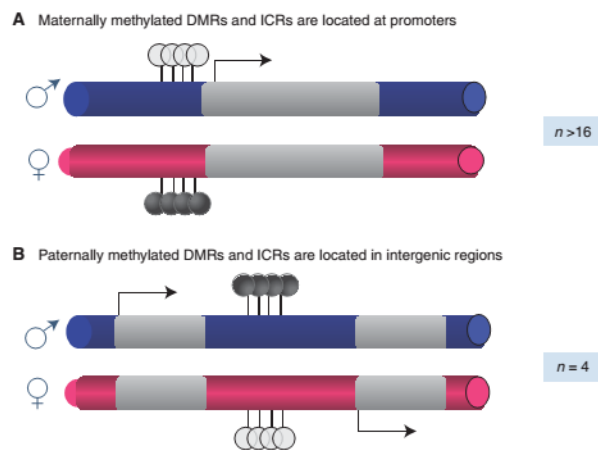


Abbildung 1-2: Unterschiede zwischen maternalen und paternalen gDMRs.

A: Für maternal methylierte gDMRs ist die ICR in Promotorregionen lokalisiert. Die Expression der geprägten Gene erfolgt vom paternalen Allel, dessen ICR unmethyliert ist. B: Für paternal methylierte gDMRs, von denen insgesamt bisher nur vier bekannt sind, liegt das ICR in intergenischen Regionen. Auf dem maternalen Allel liegt die ICR unmethyliert vor. CpGs der DMRs sind hier als Lollipops dargestellt, wobei schwarze Kreise für Methylierung stehen und durchsichtige Kreise unmethylierte CpGs darstellen (Abbildung aus [20]).

Die Expressionsregulation geprägter Gene erfolgt über zwei Mechanismen:

- Das Insulator-Modell, wie es am *H19 / IGF2*-Locus auftritt
- Das non-coding RNA-Modell

Das Insulator-Modell ist das evolutionär ältere, aber am wenigsten genutzte Modell [19]. Das maternale ICR liegt unmethyliert vor, wodurch das Insulator-Protein CTCF binden kann, was wiederum verhindert, dass der downstream-liegende Enhancer an den *IGF2*-Promotor binden kann. Allerdings hat der Enhancer Zugang zum *H19*-Promotor, was zu dessen Expression führt. Auf dem paternalen Allel ist das ICR me-

thylisiert, wodurch CTCF-Bindung und Insulator-Bildung verhindert werden und *IGF2* exprimiert werden kann [4, 17, 19, 20]. Beim evolutionär jüngeren ncRNA-Modell handelt es sich um den an den meisten geprägten Loci angewandten Regulationsmechanismus [19]. Beispiele sind der *IGFR2 / AIRN*-Locus oder der *KCNQ / KCNQ10T1*-Locus. Bei diesem Mechanismus ist der Promotor einer lncRNA innerhalb des ICRs lokalisiert. Ist das ICR unmethyliert wird die ncRNA exprimiert, wodurch die in dieser Domäne in *cis* liegenden Gene durch repressive Chromatinmarkierungen still gelegt werden, indem verhindert wird, dass die RNA-Polymerase II rekrutiert werden kann. Ist das ICR jedoch methyliert, kann keine ncRNA exprimiert werden, wodurch die proximalen Gene aktiviert werden [4, 17, 19, 20]. Die beiden Modelle sind noch einmal in Abbildung 1-3 veranschaulicht.

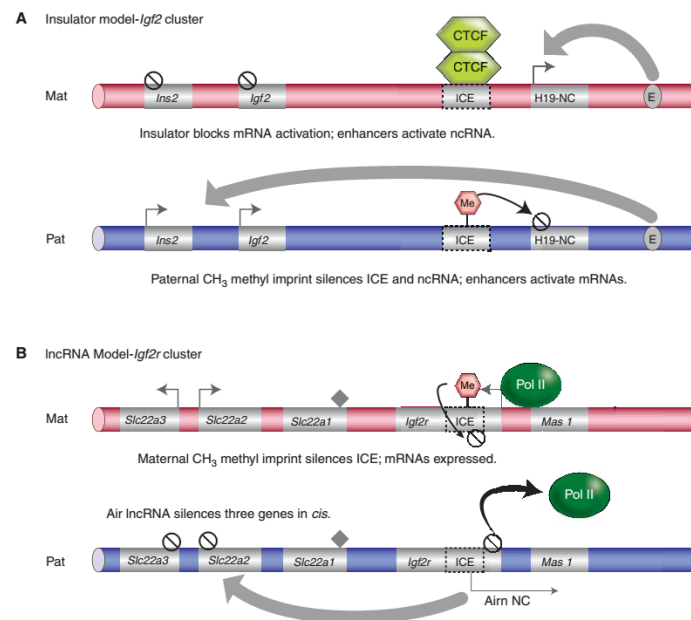


Abbildung 1-3: Expressionsregulationsmechanismen geprägter Gene – Insulator- und ncRNA-Modell.

A: Beim Insulator-Modell wird durch CTCF-Bindung an das unmethylierte ICR die Expression geprägter Gene inhibiert. Durch Methylierung des ICRs wird die CTCF-Bindung verhindert und Expression ist möglich. B: Beim ncRNA-Modell wird, wenn das ICR unmethyliert ist, eine ncRNA exprimiert, wodurch die RNA-Polymerase II nicht binden kann und Expression der geprägten Gene verhindert wird. Ist das ICR methyliert, wird keine ncRNA gebildet und RNA-Polymerase II kann binden und Expression erfolgen. (Abbildung aus [4]).

1.4 Epigenetische Reprogrammierung und Imprint-Etablierung

Während des Lebenszyklus eines Säugetiers wird sein Genom zweimal vollständig reprogrammiert. Die erste Phase dieses Prozesses erfolgt direkt nach der Befruchtung, während die zweite Phase während der Gametogenese erfolgt. Dieser Prozess

wird als epigenetische Reprogrammierung bezeichnet [3, 5-7, 12, 16, 18-21]. Der Ablauf ist in Abbildung 1-4 dargestellt.

Epigenetische Reprogrammierung dient der Etablierung des totipotenten Zustandes der Zygote, indem DNA-Methylierung überall, außer an geprägten Genen und TEs, entfernt wird. Während der folgenden Zellteilungen wird eine graduelle Remethylierung des Genoms vorgenommen. Diese Etablierung zygotischer Methylierungsmuster ist unabdingbar für die folgende Spezifizierung der Keimblätter sowie der weiteren Entwicklung und Differenzierung des Organismus [2, 6]. Die zweite Phase der epigenetischen Reprogrammierung, bei der alle Bereiche des Genoms, auch die geprägten Gene, demethyliert werden, dient der Etablierung keimzellenspezifischer Methylierungsmuster und vor allem der Etablierung neuer geschlechtsspezifischer Imprints [6, 23].

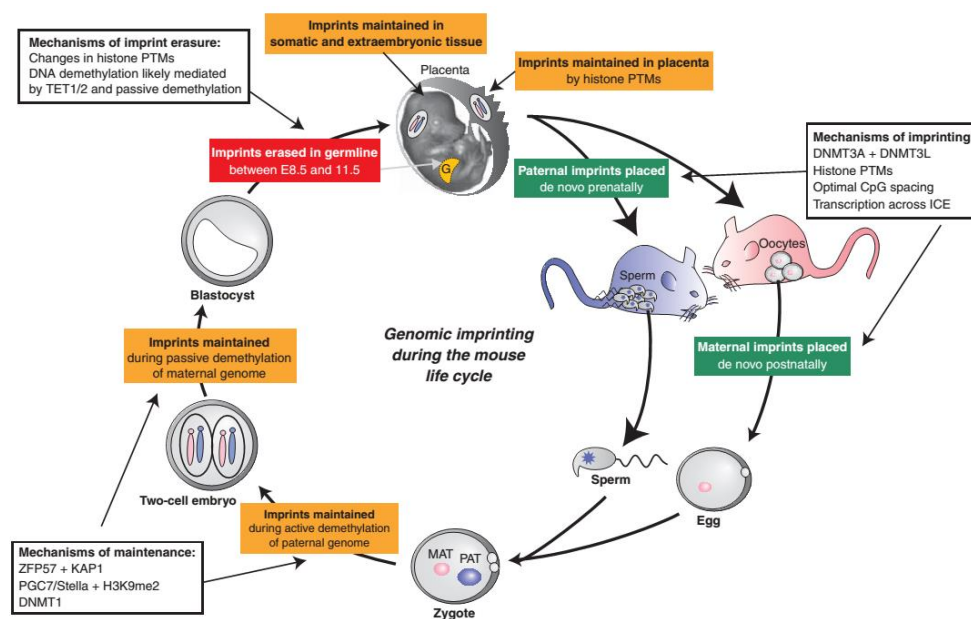


Abbildung 1-4: Epigenetische Reprogrammierung.

Die erste Phase der Reprogrammierung erfolgt direkt nach der Befruchtung. Geprägte Gene werden hierbei vor der Demethylierung geschützt, da somatische Zellen die parentale Herkunftsinformation der Allele für ihre entsprechende Expressionsregulation benötigen. Die zweite Phase der Reprogrammierung erfolgt in der Keimbahn. Hier schließt die Reprogrammierung auch die Entfernung der Imprints geprägter Gene ein, wobei nicht nur DNA-Methylierung entfernt wird, sondern auch posttranslationelle Modifikationen (PTM) der Histone verändert werden. Die Etablierung neuer geschlechtsspezifischer Imprints erfolgt in den Keimbahnen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. (Abbildung aus [2]).

Direkt nach der Befruchtung, noch bevor die beiden parentalen Pronuklei fusionieren, findet eine globale Demethylierung der parentalen Genome statt [2]. Dabei werden die Genome jedoch nicht gleich behandelt. Das paternale Genom wird noch vor der

ersten Zellteilung aktiv über enzymatische Modifikationen des 5mC demethyliert, während das maternale Genom seine Methylierung passiv während der folgenden Zellteilungen verliert [2, 3, 23]. Aktive Demethylierung des paternalen Genoms wurde bisher in der Maus, Ratte, Schwein, Rind und dem Menschen beobachtet [18]. Die passive Demethylierung des maternalen Genoms wird erreicht, indem während der folgenden Zellteilungen die oocytenspezifische DNMT1-Isoform aus dem Nukleus ausgeschlossen wird und deshalb neu synthetisierte DNA-Stränge keine Methylierung erhalten [2]. Das größte Ausmaß an Demethylierung erreicht das maternale Genom kurz vor dem Blastozystenstadium [23]. Das paternale Genom wird mittels TET3 aktiv demethyliert [23]. Die paternale protamingebundene Spermien-DNA wird außerdem remodelliert und Protamine werden durch maternale Histone ersetzt. Das maternale Genom behält hingegen seine Histone und daran enthaltene Markierungen, wodurch eine Asymmetrie der Genome entsteht, welche bis in das 4-Zell-Stadium erhalten bleibt [23].

Das an der aktiven Demethylierung des paternalen Genoms beteiligte TET3 ist ein Enzym der TET (ten eleven translocation)-Proteinfamilie, die zur Familie der 2OG-Fe(II)-Dioxygenasen gehört. TET-Enzyme generieren Hydroxylierung von 5mC zu Hydroxymethylcytosin (5hmC) (siehe Abbildung 1-5) [28]. Bisher sind 3 verschiedene TET-Isoformen bekannt, mit unterschiedlichen Funktionen während der Entwicklung eines Organismus. TET3 ist während der frühen Embryogenese im paternalen Pronukleus zu finden [2]. Die Isoformen TET1 und TET2 zeigen teils gemeinsame, teils gegensätzliche Funktionen. 5mC und 5hmC sind beide angereichert innerhalb der Genkörper aktiv transkribierter Gene. An Stellen, die der Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen dienen, ist 5mC verringert, während 5hmC besonders an von regulatorischen Proteinen gebundenen genomischen Regionen (TSS, Promotoren, Enhancer) angereichert ist [2]. Das maternale Genom wird unter anderem durch den Faktor STELLA vor TET-vermittelter aktiver Demethylierung geschützt [23].

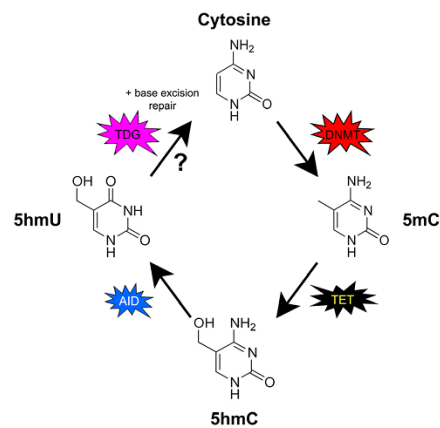


Abbildung 1-5: DNA-Methylierung und Demethylierung.

Cytosin kann mittels DNMTs am 5'-C-Atom methyliert werden. Über Enzyme der TET-Familie kann methyliertes Cytosin (5mC) weiter modifiziert werden zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC). Dieses wiederum kann über Deaminierung durch die Cytidin-Deaminase AID (activation-induced deaminase) weiter umgesetzt werden zu 5-Hydroxymethyluracil (5hmU). Die Glycosylase TDG (thymine-DNA-glycosylase) initiiert über Basenexzisionsreparatur eine Demethylierung, wodurch wieder unmethyliertes Cytosin erhalten wird. (Abbildung aus [2]).

Während dieser ersten Reprogrammierungswelle entgehen geprägte Gene sowie einige Retrotransposons der Demethylierung, da der Erhalt der Imprints geprägter Gene notwendig ist für die spätere parental-spezifische Expression in somatischen Zellen und Retrotransposons methyliert bleiben müssen zur Aufrechterhaltung der Genomstabilität [23]. Damit die genomische Prägung erhalten bleibt, gibt es verschiedene Schutzfaktoren. Einer dieser Faktoren ist ZFP57, das nicht nur in die Aufrechterhaltung der Methylierung mehrerer DMRs involviert ist, sondern während der Remethylierung in Oocyten auch an der Etablierung des maternalen Imprints für *Snrpn* beteiligt ist [16, 20]. Daneben dient auch Stella der Aufrechterhaltung maternalen und paternalen ICR-Methylierung [16, 20]. TRIM28 kann zusammen mit ZFP57 ein Netzwerk aus mit DNA-Methylierung und Histonmodifikationen assoziierten Faktoren rekrutieren, einschließlich der de novo DNMTs und DNMT1 [23].

Die zweite Phase der epigenetischen Reprogrammierung erfolgt in den Keimzellen eines Organismus und dient der Etablierung neuer geschlechtsspezifischer Imprints geprägter Gene [3, 12]. Die primordialen Keimzellen (PGCs) werden im frühen Embryo aus somatischen Zellen rekrutiert, aus einer kleinen Population posterior proximaler Epiblastzellen [23, 29]. Deshalb müssen zunächst alle im Genom enthaltenen somatischen Methylierungsmuster wieder entfernt werden [23]. Damit geprägte Gene neue, dem Geschlecht des Embryos entsprechende, Methylierungsmuster erhalten können, müssen geerbte Methylierungsmuster entfernt werden [23]. Während die

PGCs zu den sich entwickelnden Gonaden migrieren, setzen die Chromatinveränderungen ein und werden fortgesetzt, wenn die PGCs die Gonaden erreicht haben. Die 5mC-Konzentration nimmt ab, wobei nicht nur die DNA, sondern auch Histone demethyliert werden, was in einer veränderten Genexpression resultiert. Diese Demethylierung betrifft 80 bis 90% des Genoms, wobei jedoch Retrotransposons wie *IAP* resistent gegen diese Demethylierung sind [29]. Die Demethylierungsprozesse sind aktiv und passiv. Wieder sind Enzyme der TET-Familie involviert. TET1 und TET2 katalysieren aktive Demethylierung an Promotoren und in Genkörpern [23]. Außerdem wird die Methylierung neu replizierter DNA verhindert, indem DNMT1 in PGCs reprimiert wird. Dies geschieht dadurch, dass der DNMT1-Rekrutierungsfaktor UHRF1 nicht exprimiert wird [17, 23]. Zusätzlich wird die Expression der de novo DNMTs herunter reguliert [23].

Die Etablierung neuer Imprints erfolgt in den Keimbahnen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten. Maternale gDMRs werden postnatal während des Oocytenwachstums etabliert, nachdem die Oocyten ihre erste meiotische Teilung beendet haben. Die 4 paternalen gDMRs (*H19/Igf2*, *Dlk1/Dio3*, *Rasgrf1* und *Zdbf2*) werden schon pränatal in mitotisch arretierten Prospermatogonien, also vor Eintritt in die Meiose, etabliert [4, 9, 12, 20, 23, 30]. Die Remethylierung der gDMRs erfolgt über die de novo DNMTs. DNMT3A und DNMT3L werden in beiden Keimbahnen exprimiert und sind an der Remethylierung fast aller gDMRs beteiligt, mit Ausnahme der paternal methylierten *Rasgrf1*-gDMR, die zusätzlich DNMT3B benötigt [17, 19, 20, 23, 30]. DNMT3B ist involviert in die Methylierung von retrotransposablen Elementen (REs). *Rasgrf1* enthält eine Vielzahl repetitiver Elemente [23]. Zusätzlich wird in der paternalen Keimbahn für die de novo Methylierung von REs der piRNA-Weg benötigt und ebenso für die Methylierung der *Rasgrf1*-gDMR [23]. Diese Piwi-interacting RNAs (piRNAs) sind kleine RNAs in den Keimzellen, welche PIWI-Proteine binden und während der Spermatogenese in die Stilllegung von Retrotransposons involviert sind, indem sie die DNA-Methylierungsmaschinerie zu den Retrotransposons rekrutieren [7]. Solche piRNA-bindenden Proteine sind beispielsweise MILI und MIWI2 [16]. DNMT3L als Cofaktor von DNMT3A und DNMT3B ist zwar involviert in die Remethylierung aller DMRs, nicht jedoch in die Etablierung globaler Methylierung, d.h. Methylierung solcher TEs [19]. Außerdem besitzen fast alle bekannten gDMRs ein Bindungsmotiv für ZFP57, das während der ersten Demethylierungswelle nach der Befruchtung eine Schutzfunktion besitzt und in Oocyten in die Remethylierung

von *Snrpn* involviert ist [16, 23]. Des Weiteren ist bekannt, dass es in Oocyten zu einer asynchronen Initiation der Remethylierung kommt, also unterschiedliche gDMRs zu verschiedenen Zeitpunkten remethyliert werden. So wird z. B. *Snrpn* vor *Igfr2*, *Peg3* und *Peg1* methyliert, welche wiederum noch vor *Impact* methyliert werden [23, 30].

Während der Spermatogenese findet nach der Meiose in haploiden runden Spermatischen eine extensive Chromatin-Remodellierung statt, wodurch es zum genomweiten Austausch der Histone gegen Protamine kommt [29]. Dabei bleibt jedoch ein Teil der Histone (Maus: 1%; Mensch: 10%) erhalten, einschließlich ihrer posttranslationalen Modifikationen. Dies stellt einen Mediator transgenerationaler Vererbung dar [29]. Die meisten Histonmethylierungen eines Embryos werden jedoch über die weibliche Keimbahn vererbt. In frühen Embryonen unterscheidet sich die Heterochromatinsequenz hinsichtlich ihrer Markierungen in den paternalen und maternalen Pronuclei [29]. Des Weiteren trägt das maternale Genom eine spezielle Histon H2-Variante, welche in Oocyten während der Wachstumsphase detektierbar ist und auch nach der Befruchtung mit dem maternalen Chromatin assoziiert bleibt [29]. Indem bestimmte epigenetische Markierungen auch nach der Befruchtung erhalten bleiben, kann eine transgenerationale Vererbung erfolgen.

Eine bedeutende Frage ist, wie erkannt wird, welche Bereiche des Genoms neu methyliert werden sollen. Hier steht man gerade erst am Anfang, die involvierten Mechanismen zu identifizieren. Dazu wurden bisher verschiedene Lösungsansätze untersucht. Zunächst wurden de novo DNMTs untersucht. DNMT3A und DNMT3B zeigen unterschiedliche Sequenzpräferenzen. Allerdings werden diese Präferenzen aufgehoben, sobald sie mit ihrem Cofaktor DNMT3L interagieren. Die Zielsequenzen sind also nicht von Bedeutung [31]. Eine Sequenzeigenschaft geprägter Loci ist das Vorkommen repetitiver Elemente, insbesondere Tandem Repeats. Genomweite Analysen konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Frequenz von Tandem Repeats und dem Methylierungsstatus herstellen [19, 31]. Inwiefern der räumliche Abstand zwischen CpGs (CpG Spacing) innerhalb der DMRs eine Rolle spielt, ist derzeit noch unklar. Der DNMT3A-3L-Komplex zeigt eine optimale CpG-Periodizität von 8-10 bp zwischen zu methylierenden CpGs [19, 20]. Diese 8-10 bp Periodizität konnte für maternale DMRs gefunden werden, allerdings konnte es nicht für paternale DMRs bestätigt werden und es gibt keinen Unterschied zwischen methylierten und

unmethylierten DMRs [16, 19, 20, 31]. Des Weiteren werden LINE-TEs mittels des DNMT3A-3L-Komplexes methyliert, zeigen allerdings keine CpG-Periodizität [31].

Zunehmend wird jedoch erkannt, dass Transkription eine besondere Rolle in der Etablierung von gDMR-Imprints spielt. Wenn Oocyten in die Wachstumsphase rekrutiert werden, kommt es zu einer Zunahme transkriptioneller Aktivitäten [29]. Während der Oocytenentwicklung verändert sich das Chromatin. Zunächst liegt es dekondensiert vor und ist mit transkriptioneller Aktivität assoziiert. Zum Ende der Oocytenwachstumsphase liegt das Chromatin kondensiert vor, damit die Meiose bis zum Re-Arrest im Metaphase II-Stadium fortgeführt werden kann. Während dieses kondensierten Chromatinzustandes ist keine Transkription detektierbar [29, 32]. Gleichzeitig korreliert die Zunahme der Methylierung mit der Wachstumszunahme der Oocyte und auch die Expression der verschiedenen DNMTs (3A, 3L, oocyten-spezifische 1o) nimmt mit zunehmendem Oocytendurchmesser zu [23, 30, 32]. Transkription durch die ICR-Sequenz ist dabei ein Schlüsselschritt in der Etablierung von Methylierungsmustern durch DNMTs [17]. Viele geprägte gDMRs liegen intragenisch, oftmals downstream alternativer Promotoren [30, 31]. Während Transkription und Elongation durch die gDMRs verlaufen, bedingt dies scheinbar eine Chromatin-Remodellierung, welche für die de novo Methylierung nötig ist [23, 31]. Mittels Transkription wird ein offener Chromatinzustand erreicht, welcher wiederum DNA-Methylierung erleichtern könnte, da die Maschinerie leichteren Zugang zur DNA bekommt [19]. Auch die Asynchronie der Methylierung unterschiedlicher gDMRs könnte damit erklärt werden, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Oocytenwachstums die Transkription durch unterschiedliche gDMRs und somit die Imprint-Etablierung initiiert wird [30]. Die Demethylase KDM1B ist kritisch für die Etablierung von Imprints an vielen maternalen DMRs. Das humane Ortholog LSD2 ist assoziiert mit den Genkörpern aktiv transkribierter Gene [19]. Die Methyltransferaseaktivität von DNMT3A kann außerdem erhöht werden, wenn es an die Histonmodifikation H3K36me3 bindet, welche eine Markierung transkriptionaler Elongation darstellt. All dies sind Hinweise darauf, dass de novo Methylierung zu Stellen aktiver Transkription dirigiert wird [19, 31]. Dass Transkription in die Etablierung von Imprints involviert ist, konnte bereits für den *Gnas*-Locus und viele weitere Loci nachgewiesen werden [16, 20, 23].

Des Weiteren gibt es ein Zusammenspiel von Histon- und DNA-Methylierung. DNMT3L zeigt Bindungsaffinität für Nukleosomen mit unmethyliertem H3K4 [16, 19,

31]. Dieses unmethylierte H3K4 wiederum ist notwendig für die Etablierung von DNA-Methylierung [19]. Trimethylierung des Histons hingegen verhindert Methylierung indem die Rekrutierung der DNMT-Maschinerie verhindert wird. Dieses konnte genomweit detektiert werden [7, 16, 19]. H3K4-Methylierung muss mittels der Histon-Demethylase KDM1B entfernt werden, um DNA-Methylierung zuzulassen. KDM1B wird nur in wachsenden Oocyten exprimiert, aber ein ähnlicher Mechanismus könnte in Spermien vorliegen [16]. Die Muster der Histonmethylierungen diktiert somit scheinbar die Muster der DNA-Methylierung [19].

1.5 Imprinting-Störungen und Syndrome

Wird die Etablierung oder Aufrechterhaltung von Imprints geprägter Gene in irgendeiner Weise gestört, führt das zu Fehlregulationen der Genexpression betroffener geprägter Regionen. Es sind eine Anzahl seltener kongenitaler Störungen bekannt, die durch ebensolche Missregulationen oder durch Mutationen innerhalb geprägter Gene hervorgerufen werden. Diese Störungen werden entsprechend als Imprinting-Erkrankungen bezeichnet [17, 33]. Zu den bekanntesten gehören die in Tabelle 1-1 aufgeführten Verhaltens- und Neuronalentwicklungsstörungen Prader-Willi-Syndrom (PWS) und Angelman-Syndrom (AS) sowie die Wachstumsstörungen Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) und Silver-Russel-Syndrom (SRS). Des Weiteren gibt es noch das maternale bzw. paternale UPD14-Syndrom, den transienten neonatalen Diabetes mellitus (TND) und den Pseudohypoparathyroidismus 1b (PHP-1b) [17, 20, 33]. Die Ursachen sind unterschiedlich, können aber grundsätzlich unterteilt werden in genetische und epigenetische Mechanismen [33]. Zu den genetischen Mechanismen gehören:

- Große Deletionen oder Duplikationen chromosomaler Regionen mit geprägten Genen.
- DNA-Mutationen in geprägten Genen oder ihren Imprint-Kontrollzentren.
- Uniparentale Disomien (UPD), wobei ein Chromosom oder eine Chromosomenregion nur von einem Elternteil geerbt wurde [20, 33, 34].

Neben genetischen Ursachen gibt es auch Epimutationen, d. h. Veränderungen der DNA-Methylierung (Hypomethylierung, Hypermethylierung) oder veränderte Histon-

modifikationen, welche während der Imprint-Entfernung, Etablierung oder Aufrechterhaltung entstanden sind [33].

Tabelle 1-1: Imprinting-Syndrome.

Klinische Phänotypen und Ätiologie der verschiedenen bisher bekannten Imprinting-Erkrankungen (Tabelle aus [20]).

Syndrome	Clinical features	Etiology	Mouse chromosome
Angelman syndrome (AS)	Mental retardation, speech impairment, ataxia, seizure, microcephaly	15q11.2-q13 deletion (70%) PatUPD15 (7%), <i>UBE3A</i> mutation (11%), methylation defects (3%), epimutation	7C
Prader-Willi syndrome (PWS)	Neonatal hypotonia, childhood obesity, cognitive impairment, behavioral characteristics, hypogonadism	De novo paternal deletion in 15q11-q13 (70%), MatUPD15 (29%), imprinting defects (1%)	7C
Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS)	Pre/postnatal overgrowth, neonatal hypoglycemia, exomphalos, macroglossia, hemihypertrophy, increased embryonal tumors	Epimutation of <i>IGF2/H19</i> DMR1, epimutation of <i>KCNQ1/CDKN1C</i> DMR2 both on 11p15, hypomethylation of DMR2 (50%), hypermethylation DMR1 (2%–7%), PatUPD11, <i>CDKN1C</i> mutation	7F5
Silver-Russell syndrome (SRS)	Intrauterine/postnatal growth retardation, variable features (inc. 5th finger clinodactyl, learning disabilities)	Paternal DMR1 hypomethylation at 11p15 (> 50%), MatUPD7 (5%) Matdup11p15, unknown (30%)	7F5
Maternal UPD14 (and UPD14 mat-like) syndrome	Low birth weight, short stature, characteristic facies, premature puberty, hypotonia	MatUPD14, paternal microdeletions at 14q32.2, hypomethylated DMRs at <i>DLK1/GTL2</i>	12F1
Paternal UPD14 (and UPD14 pat-like) syndrome	Bell-shaped thoracic cage, mental retardation, placentomegaly, polyhydramnios	PatUPD 14, maternal microdeletions at 14q32.2, hypermethylation at DMRs at <i>DLK1/GTL2</i>	12F1
Pseudo-hypoparathyroidism 1b	Resistance to parathyroid hormone, hypocalcaemia, hyperphosphatemia	Microdeletion upstream of <i>GNAS</i> at 20q, maternal hypomethylation, PatUPD20	2H4
Transient neonatal diabetes mellitus	Growth retardation, hyperglycemia with low/undetectable insulin resolved by 6 months old, 40% Type2 diabetes later in life	Paternal UPD6, paternal duplication 6q22-q23, maternal hypomethylation at <i>ZAC1/PLAGL1</i> DMR	10A2

In BWS sind die geprägten Regionen für *H19 - IGF2* sowie der *CDKN1C*-Locus involviert. Etwa 1:13700 Kindern ist von dieser Wachstumsstörung betroffen. Intellektuell entwickeln sich die Kinder normal. Der klinische Phänotyp beinhaltet unter anderem prä- und postnatales übermäßiges Wachstum, Makroglossie und ein erhöhtes Tumorrisiko, insbesondere Wilms-Tumor [17, 20, 33-35].

Beim SRS ist ebenfalls der *H19 / IGF2*-Locus involviert, aber auch die geprägten Loci für *GRB10*, *MEST (PEG1)* oder *PEG3*. SRS ist ein sehr heterogenes Syndrom mit Assoziationen zu mehr als 8 verschiedenen Chromosomenregionen [36]. Phänotypisch zeigen sich intrauterin und postnatal vermindertes Wachstum und Asymmetrie bei etwa 1:100000 Kindern [17, 20, 33].

Beim PWS ist der *SNRPN-UBE3A* geprägte Locus betroffen. PWS findet man etwa bei 1:17500 Kindern. Charakteristisch sind hypothalamische Dysfunktionen, kindliche Adipositas, kognitive Beeinträchtigungen und verzögerte intellektuelle Entwicklung [17, 20, 33, 34].

Beim AS ist ebenfalls der *SNRPN-UBE3A*-Locus gestört. Die Inzidenz liegt bei 1:15000 bis 1:16000. Klinische Kennzeichen sind mentale Retardierung, Entwicklungsverzögerungen, Sprachbeeinträchtigungen und Ataxie [17, 20, 33-35].

Beim TND ist die *PLAGL1*-Region betroffen mit einer Inzidenz von etwa 1:400000. Zum Zeitpunkt der Geburt tritt ein transients Diabetes mellitus auf sowie Hyperglykämie und Wachstumsretardierung. Zusätzlich entwickeln 40% der Betroffenen im späteren Leben einen Diabetes Typ 2 [17, 20, 33, 34].

Die uniparentale Disomie des Chromosoms 14 (UPD14) involviert den *DLK1-GTL2*-Locus. Bei matUPD14 zeigen sich geringes Geburtsgewicht, prä- und postnatale Wachstumsretardierung und frühzeitige Pubertät. PatUPD14 bedingt mentale Retardierung und Entwicklungsverzögerungen [17, 20, 33, 37-39]. Bisher sind etwa 50 matUPD14- und etwa 30 patUPD14-Fälle beschrieben. MatUPD14 kann auch durch eine Chromosom 14 involvierende Robertson-Translokation bedingt werden [33].

PHP-1b betrifft den *GNAS*-Locus und bewirkt Parathyroid-Hormonresistenz, geringe Energie und Muskelkrämpfe [17, 20, 33, 34]. Es tritt familiär und sporadisch auf, wobei familiäre Formen meist eine 3 kb-Mikrodeletion upstream des *GNAS*-Locus zeigen, während sporadische Fälle hauptsächlich Epimutationen zeigen [33].

1.6 Epigenetische Besonderheiten des Spermiengenoms

Spermien haben eine speziell an ihre Funktion angepasste Morphologie. Während der Spermatogenese erfolgen spezifische Chromatinmodifikationen, um die Spermien-DNA zu kompaktieren (siehe Abbildung 1-6), wodurch die DNA 6 bis 20 mal dichter gepackt ist als normale nukleosomgebundene DNA [28]. Dazu werden 90 bis 95% aller Histone durch Protamine ersetzt. Die Protamination bedingt eine erhöhte Spermienmotilität und schützt das paternale Genom innerhalb des weiblichen Reproduktionstraktes vor oxidierenden und anderen schädlichen Molekülen [3, 12, 28].

Transkriptionelle Aktivität wird unterbunden und Protamination stellt somit einen nicht-traditionellen epigenetischen Mechanismus dar [3, 28]. Protamination ist ein Prozess, der über mehrere Zwischenschritte abläuft [3, 28]. Zunächst werden spermienspezifische Histonvarianten exprimiert. Danach nimmt die Acetylierung der Histone zu. Das testisspezifische BRDT (bromodomain containing protein testis-specific) interagiert mit acetylierten Histonen und induziert Chromatinkompaktierung, bei der zunächst Histone gegen die Transitionsproteine TP1 und TP2 ausgetauscht werden, welche durch die Protamine P1 und P2 ersetzt werden [3, 28, 40]. Allerdings werden nicht alle Histone ersetzt. In fertilen Männern bleiben 5 bis 15% der Histone erhalten [3, 12, 28, 40]. Diese Histone sind nicht zufällig über das Genom verteilt. Durch den Erhalt der Histone und ihrer Modifikationen könnte ein epigenetischer Einfluss auf die Transkriptionsregulation nach der Befruchtung genommen werden [3, 28]. Histone bleiben vor allem an regulatorischen Regionen erhalten wie z. B. an Promotoren von Genfamilien, die in Entwicklungsprozesse involviert sind oder an mikro-RNA-Clustern oder Loci geprägter Gene [3, 12, 28].

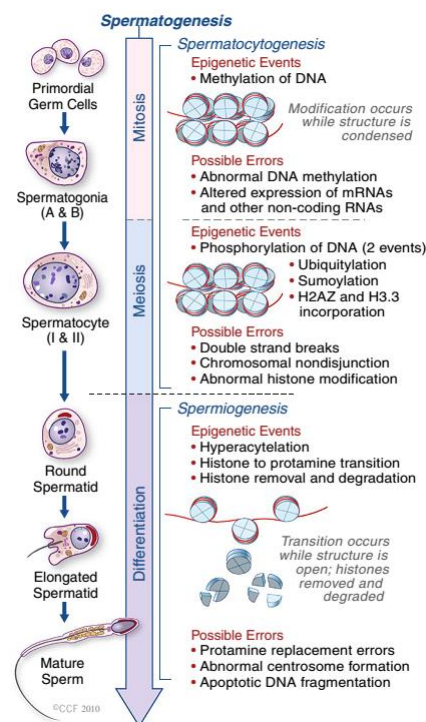


Abbildung 1-6: Epigenetische Modifikationen paternaler DNA während der Spermatogenese.

Dargestellt sind die verschiedenen Phasen der Spermienentwicklung. Während der mitotischen Phase werden paternale Imprints etabliert. Für die Meiose sind für Rekombination und Bildung des XY-Körpers die Phosphorylierung der DNA und Modifikationen der Histone notwendig. Für den Histon-Protamin-Austausch während der Differenzierungsphase ist zunächst eine Hyperacetylierung der Histone erforderlich. (Abbildung aus [40]).

1.7 Infertilität und assistierte reproduktive Technologien (ART)

Die WHO (World Health Organization) definiert Infertilität als Erkrankung des Reproduktionssystems, wodurch nach 12 oder mehr Monaten ungeschützten Geschlechtsverkehrs keine klinische Schwangerschaft erreicht werden konnte [41, 42]. Weltweit ist eine Abnahme der Fertilität zu verzeichnen [41]. Infertilität wird durch multiple Faktoren bedingt. Infektionen, Umwelteinflüsse, genetische Faktoren und Ernährung können männliche und weibliche Fertilität beeinträchtigen. Eine Rolle spielt auch das Alter zum Zeitpunkt des Versuchs ein Kind zu zeugen, das zunehmend ansteigt [41]. Infertilität betrifft etwa 10 bis 15% aller Paare mit Kinderwunsch, wovon etwa 1/3 männliche Infertilität zeigen und 1/3 kombinierte Infertilität, d. h. Fertilitätsprobleme sowohl männlicherseits als auch weiblicherseits [12, 43]. Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch kann heutzutage jedoch durch verschiedene unter dem Begriff ART zusammengefasste Techniken geholfen werden. Assistierte reproduktive Technologien (ART) bezeichnen alle Behandlungsarten und Prozeduren, bei denen *in vitro* mit humanen Oocyten und Spermien gearbeitet wird, mit dem Ziel eine Schwangerschaft zu etablieren [42]. Zu diesen Techniken gehören die *In-vitro*-Fertilisation (IVF), bei der Oocyte und Spermien außerhalb des Körpers in einem Reaktionsgefäß für eine Befruchtung zusammengeführt werden, sowie die intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI), bei der ein einzelnes Spermium ausgewählt und in die Oocyte injiziert wird [42]. Die Frau wird dazu einer kontrollierten ovariellen Stimulation (COS) unterzogen, wobei mittels hormoneller Behandlung die Entwicklung mehrerer ovarieller Follikel induziert wird, um daraus für die Folgebehandlung mehrere Oocyten gleichzeitig zu gewinnen [42]. Eine andere Möglichkeit ist die *In-vitro*-Maturation (IVM). IVM ist definiert als die *In-vitro*-Kultur von Cumuluszellen-Oocyten-Komplexen (COCs). COCs werden aus kleinen antralen Follikeln gewonnen, wenn die Follikel nur 10 bis 12 mm groß sind und noch kein dominanter Follikel definiert wurde, weshalb die anderen Follikel noch nicht atretisch sind und sich potentiell alle zu reifen Oocyten entwickeln können. Die Frau wird vorher keiner hormonellen Stimulation unterzogen. Die Oocyten sind bei Entnahme alle im Germinalen Vesikel-Stadium (GV) und werden erst außerhalb des Körpers in Kultur gereift [44, 45]. Diese Art der IVM wird als „genuine“ (echte) IVM bezeichnet. Des Weiteren gibt es noch die „rescue“ IVM, bei der durch COS gewonnene Oocyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien nochmals *in vitro* nachgereift werden [44].

1.7.1 Ursachen männlicher Infertilität

Ein Spermogramm kann die Spermienqualität eines Mannes beurteilen. Dabei zeigen infertile Männer unterschiedliche Defekte. Azoospermie bezeichnet das Fehlen von Spermien im Ejakulat [46]. Bei Asthenozoospermie ist der Anteil progressiv motiler Spermatozoen geringer als der normale Referenzwert [46]. Oligozoospermie bezeichnet eine zu geringe Anzahl an Spermatozoen im Ejakulat [46]. Teratozoospermie hingegen beschreibt, dass der Prozentsatz morphologisch normal geformter Spermatozoen geringer als normal ist [46]. Das OAT-Syndrom, also eine Oligo-Astheno-Teratozoospermie, bezeichnet den Zustand, dass Spermienkonzentration sowie die Prozentsätze morphologisch normaler und progressiv motiler Spermatozoen allesamt zu gering sind [46]. Die zur Beurteilung notwendigen normalen Referenzwerte werden regelmäßig von der WHO ermittelt (siehe Kapitel 2.4.1). Einige häufige Ursachen männlicher Infertilität sind in Tabelle 1-2 angegeben.

Tabelle 1-2: Genetische Ursachen und Umwelteinflüsse, die männliche Infertilität bedingen können.

(Tabelle aus [47]).

<i>Genetic</i>	<i>Environmental</i>
Obstruction of the ejaculatory ducts (eg cystic fibrosis (CF), congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD))	Exposure to environmental toxins (eg pesticides, glycol ethers, heavy metals, radiation, chemotherapy agents, heat exposure)
Y-chromosome microdeletion	Infection (eg mumps orchitis, epididymitis, urethritis)
Endocrine abnormalities (eg congenital adrenal hyperplasia, isolated follicle-stimulating hormone (FSH) deficiency, hyperprolactinemia)	Immunologic abnormalities (eg antisperm antibodies)
Hypothalamic-pituitary disease	Trauma
Vascular abnormalities (eg varicocele)	
Testicular tumors	
Germ-cell aplasia	
Sertoli-cell-only syndrome (SCOS)	
Aneuploidies (eg Klinefelter's syndrome (XXY))	
Single-gene mutations (eg <i>CATSPER1</i> , <i>AKAP3/4</i> , <i>DNAH1/5/11</i>)	

Chromosomenaberrationen können numerisch oder strukturell sein und Geschlechtschromosomen oder Autosomen betreffen [48]. Karyotypabnormalitäten bedingen etwa 10% männlicher Infertilität [12]. Ein Aneuploidie-Bespiel ist das Klinefelter-Syndrom (47, XXY), das in 11 bis 14% aller nicht-obstruktiven Azoospermie-Patienten vorliegt [48-50]. Des Weiteren können reziproke oder unbalancierte

Translokationen Ursachen für Azoospermie sein. Auch eine Robertson-Translokation t(14; 21) kann zu Azoospermie oder Oligozoospermie führen [48].

Das Y-Chromosom trägt für die Spermatogenese bedeutende Gene. Unter anderem befindet sich hier die AZF-Region (azoospermia factor). Deletionen dieser AZF-Region führen zu Spermatogenesedefekten [48]. Die häufigste genetische Ursache männlicher Infertilität sind das Y-Chromosom betreffende Mikrodeletionen und in 15% der Fälle sind diese Mikrodeletionen in der AZF-Region lokalisiert [48, 50]. Mikrodeletionen von *DAZ* (deleted in azoospermia) können in 3% aller azoospermen oder schwer oligozoospermen Männer nachgewiesen werden [12, 51]. Zur humanen *DAZ*-Genfamilie gehören neben den Y-chromosomal lokalisierten *DAZ*-Genen noch *DAZL* auf Chromosom 3 und *BOULE*-Homologe auf Chromosom 2. *DAZL* und *BOULE* dienen beide als Meioseregulatoren [51, 52]. Patienten mit Spermatogenesedefekten zeigen verringerte Konzentrationen an *BOULE* mRNA-Transkripten [52]. In Männern mit OAT-Syndrom sowie in oligo- und asthenozoospermen Männern wurden abnorme Methylierungen des *DAZL*-Promotors detektiert [12, 28, 53, 54]. Auch andere Einzelgendefekte können Spermatogenese oder Spermienfunktion beeinträchtigen, z. B. führen Mutationen in *AKAP3* oder *AKAP4* (A-kinase anchoring protein) zu Spermienimmotilität, während Mutationen in den Dynein-Genen *DNAI1*, *DNAH5* oder *DNAH11* zum Karthagener-Syndrom und Asthenozoospermie führen können. Auch Mutationen in den Genen *CATSPER1* und *CATSPER2*, welche für spermien-spezifische Calciumionen-induzierte Kanäle kodieren, können Infertilität bedingen [47, 55].

Auch der Histon-Protamin-Austausch während der Spermatogenese kann Fertilität beeinflussen. Knock-out-Experimente zeigten, dass wenn eines der beiden Transitionsproteine nicht vorhanden ist, das andere Transitionsprotein das Fehlende zwar teilweise kompensieren kann, dass es aber dennoch zu einer Infertilität kommt [3]. Von größerer Bedeutung sind jedoch die Protamine. Die humanen Protamine P1 und P2 werden im Verhältnis 1:1 exprimiert. Eine veränderte P1:P2-Ratio kann Subfertilität oder gar Infertilität bedingen, da vermehrt DNA-Schädigungen auftreten und sich die Spermienqualität insgesamt verringert [3, 12, 28, 40]. Abnorme Protaminierung ist häufig bei infertilen Männern mit abnormen SpermioGrammparametern [3]. Des Weiteren werden Protamine posttranslational phosphoryliert, was notwendig ist für korrekte Chromatinkompaktion. Werden Protamintranskripte inkorrekt prozessiert, kann

dies Subfertilität bedingen [3, 40]. Während bei fertilen Männern 5 bis 10% der Histone erhalten bleiben, zeigt sich bei infertilen Männern gelegentlich ein höherer Anteil zurückbehaltener Histone, wobei erhöhte Histonkonzentration mit erhöhter DNA-Schädigung korreliert [3]. Aberrante Histonmodifikationen wie Methylierung oder Acetylierung können ebenfalls verschiedene Formen der Infertilität bedingen. Kommt es zum Verlust der H3K9-Demethylase JHDM2A, führt dies zu verringerter Transkription von TP1 und P1 [28]. Infertile Patienten zeigten außerdem eine vermehrt zufällige Verteilung nicht durch Protamine ersetzter Histone, im Gegensatz zu fertilen Männern, bei denen solche Histone an bestimmten regulatorischen und für den Embryo bedeutsamen Genomregionen erhalten bleiben [28, 56]. Patienten mit abnormer Protaminierung zeigten auch Hypermethylierungen für geprägte Gene wie *LIT1*, *SNRPN*, *MEST*, *ZAC* und *PEG3* [57].

Korrekte Methylierung der Spermien-DNA sowohl geprägter als auch nicht geprägter Gene ist essentiell für eine normale Spermienfunktion, Fertilität und Embryonalentwicklung [12]. Untersuchungen an Spermien infertiler Männer zeigte veränderte Methylierungsmuster geprägter Gene für Männer mit Oligozoospermie, obstruktiver Azoospermie, defekter Protamination oder idiopathischer Infertilität [3, 28]. Hypomethylierung der *H19*-DMR und eine Assoziation mit verringerter Spermienanzahl konnte für oligozoosperme und asthenozoosperme Männer nachgewiesen werden, ebenso wie abnorme Methylierung der *MEST*-DMR in Spermien oligozoospermer Männer sowie OAT-Syndrom nachgewiesen wurde [12, 54, 57-60]. Diese Beobachtung konnte auch in Spermien von Männern mit idiopathischer Infertilität gemacht werden [61]. Hypomethylierung konnte auch an der *GTL2*-DMR in Männern mit moderater bis schwerer Oligozoospermie nachgewiesen werden, ebenso wie Methylierung an den Loci für *PEG1*, *LIT1*, *ZAC*, *PEG3* und *SNRPN*. Diese abnormen Imprinting-Muster für *H19* und *GTL2* konnten in spontanen Aborten nach ART gefunden werden, ebenso wie gezeigt wurde, dass diese Epimutationen über das väterliche Spermium auf die Nachkommenschaft übertragen worden waren [12, 57, 62, 63]. Methylierungsdefekte in Form von Hypomethylierung *ALU* repetitiver Elemente stehen zudem in Verbindung mit wiederkehrenden Schwangerschaftsverlusten [28, 64]. Methylierungsabnormalitäten wurden außerdem am Promotor des *CREM*-Gens, eines weiteren Spermatogenese-Gens, in Patienten mit abnormer Protamin-Ratio entdeckt, ebenso wie in OAT-Spermien eine abnorme Methylierung des *DAZL*-Promotors festgestellt werden konnte [12, 28, 53, 65]. Experimente an Mäusen, bei denen die Aktivität der

DNMTs durch Inhibitoren beeinträchtigt wurde, zeigte ebenfalls eine Reduktion der Fertilität, bedingt durch die unterdrückte Aktivität der DNMTs [28].

Weitere fertilitätsbeeinflussende Faktoren stellen parentales Alter und negative Umwelteinflüsse dar. Ein erhöhtes paternales Alter ist assoziiert mit verringertem Spermenvolumen, schlechterer Spermienmorphologie und geringerer Spermienmotilität sowie einer Zunahme chromosomaler Aneuploidien [40, 50]. Außerdem zeigen sich bei schlechter Spermienqualität erhöhte DNA-Fragmentation und schlechtere Chromatinpackung und dadurch bedingt schlechtere Fertilitäts- und Implantationsraten [40, 50]. Umweltfaktoren wie Gifte, Stress oder Ernährung können ebenfalls das Fertilitätspotential eines Mannes beeinflussen. Zu den Umweltgiften gehören beispielsweise Pestizide, Analgetica, Rauchen und Alkohol [47, 49]. Diese können unter anderem DNA-Methylierungsmuster verändern [49].

1.7.2 Ursachen weiblicher Infertilität

Infertilität kann bedingt werden durch Infektionen, Umwelteinflüsse, genetische Faktoren oder Ernährung [41]. Defekte können während der Entwicklung des Urogenitalsystems auftreten und dessen Funktion beeinträchtigen. Genetische Defekte können das endokrine System betreffen, einschließlich der Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden-Achse. Defekte in der Gametogenese, während der Fertilisation oder der frühen Embryonalentwicklung sind weitere Fertilität beeinflussende Faktoren [55].

Defekte während der Geschlechtsdeterminierung sind häufig durch strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen bedingt. Das weibliche Äquivalent zum Klinefelter-Syndrom (47, XXY) stellt das Turner-Syndrom (45, X0) dar, bei dem ebenfalls Infertilität vorliegt [55]. Weitere Störungen können während der Geschlechtsdifferenzierung auftreten. Das weibliche Geschlecht stellt den Urzustand dar. Dieser ovarielle Entwicklungsweg wird im männlichen Embryo durch Genprodukte von *SRY* (sex-determining region of Y) und *SOX9* (sex-determining region of Y box 9), durch Inhibition des WNT- β -Catenin-Signalweges, unterdrückt. Kommt es zu Störungen, entwickelt sich ein weiblicher infertiler Phänotyp [55]. Des Weiteren sind im Menschen hunderte Mutationen bekannt, die den Androgenrezeptor (AR) betreffen. Das *AR*-Gen befindet sich auf dem X-Chromosom und Mutationen bedingen das Andro-

geninsensitivitätssyndrom (AIS), bei dem Betroffene genotypisch männlich sind, aber weibliche äußere Genitalien entwickeln und dadurch infertil sind [48, 55].

Zusätzlich können auch Fehler während der meiotischen Rekombination Infertilität bedingen, da entweder ein meiotischer Arrest initiiert wird und Gameten nicht weiter reifen oder Aneuploidien zu Schwangerschaftsverlusten führen [55]. Mit zunehmendem Alter der Frau steigt die Aneuploidierate signifikant an, ebenso wie spontane Aborte zunehmen. Mit zunehmendem Alter nimmt nicht nur die Anzahl der verfügbaren Oocyten ab, sondern die Oocytenqualität sinkt insgesamt. Ab einem Alter von 32 Jahren beginnt die Fertilität einer Frau signifikant abzunehmen und diese Abnahme steigert sich noch einmal ab einem Alter von 37 Jahren [66, 67].

Von Bedeutung sind auch das follikelstimulierende Hormon (FSH), das luteinisierende Hormon (LH) und das thyroïdstimulierende Hormon (TSH). Diese von der Hypophyse sekretierten Hormone stehen unter Einfluss des Gonadotropin-releasing-Hormons (GNRH) und regulieren gonadale Funktionen in beiden Geschlechtern über die Interaktion mit ihren Rezeptoren. FSH spielt eine zentrale Rolle in der Stimulation des Follikelwachstums [68]. Mausexperimente zeigten, dass das Ausschalten von FSH als auch seines Rezeptors FSHR zu Infertilität führt. Natürliche Mutationen des *FSHR*-Gens sind im Vergleich zur Häufigkeit von Mutationen in den LH- oder TSH-Rezeptoren selten, da sie durch die mutationsbedingte Infertilität nicht weiter gegeben werden können [68]. Loss-of-function Mutationen des *FSHR* wurden in Frauen mit ovarieller Dysgenese (ODG), primärer und sekundärer Amenorrhoe gefunden. Gain-of-function Mutationen konnten in Frauen nachgewiesen werden, die ovarielles Hyperstimulationssyndrom (OHSS) entwickelten [68]. OHSS tritt bei manchen Frauen während der im Rahmen einer ART-Behandlung durchgeführten ovariellen Stimulation auf und ist eine systemische Überreaktion [42]. Diese Komplikation tritt zwar selten auf, ist aber ernst zu nehmen. Schlimmstenfalls kann OHSS tödlich verlaufen, z.B. durch Nierenversagen [42, 69, 70].

Eine weitere relativ häufige Ursache weiblicher Infertilität kann Endometriose sein. Es wird geschätzt, dass 25 bis 50% aller infertilen Frauen unter Endometriose leiden und 30 bis 50% aller Frauen mit diagnostizierter Endometriose zeigen Infertilität. Es handelt sich hierbei um eine östrogenabhängige, gutartige Entzündungserkrankung, deren Pathogenese jedoch unbekannt ist [71].

Auch das Gewicht hat Einfluss auf die Fruchtbarkeit einer Frau. Adipositas führt zu einer Reihe negativer reproduktiver Folgeerscheinungen wie Anovulation, unregelmäßiger Menses, Subfertilität und Fehlgeburten. Dabei wirkt sich Adipositas auf verschiedene reproduktive Prozesse aus wie ovarielle Follikelrekrutierung, Oocytenentwicklung und Oocytenqualität, Fertilisation, Embryoentwicklung und Implantation [72]. Eine Studie spontaner Schwangerschaften zeigte, dass übergewichtige Frauen häufiger Fehlgeburten erlitten als normalgewichtige Frauen. Des Weiteren benötigen diese Frauen in ART-Behandlung höhere Gonadotropindosen als normalgewichtige Frauen, um dieselbe Anzahl ovarieller Follikel zu generieren. Reife Oocyten übergewichtiger Frauen sind schlechter zu befruchten, was auf schlechtere Oocytenqualität hindeutet [72]. Adipositas beeinträchtigt verschiedene reproduktive Organe und Gewebe, einschließlich des Hypothalamus, Ovar und Follikel, Oocyte, Embryo und des uterinen Endometriums. Der Gewichtseinfluss ist am größten bei Frauen unter 35 Jahren, danach ist das Alter von größerer Bedeutung [72].

Eine weitere Ursache weiblicher Infertilität ist das Polycystische Ovarialsyndrom (PCOS). Diese endokrine Störung stellt eine der häufigsten Ursachen für Anovulation, Infertilität und Hyperandrogenismus dar und betrifft etwa 5 bis 10% aller Frauen im reproduktiven Alter [73-79]. Infertilität betrifft 40% der Patientinnen [79]. Der primäre Defekt ist eine gesteigerte Androgensynthese und Sekretion [68, 74, 80]. Die Fertilität wird reduziert durch dysfunktionale Follikelreifung und Ovulation, Fehlgeburten oder Fehlregulation reproduktiver Hormone, z. B. erhöhte LH:FSH-Ratio [68, 73, 77]. PCOS-Patientinnen zeigen Abnormalitäten des Endometriums, was erklärt weshalb Patientinnen in ART-Behandlung geringe Schwangerschaftsraten aber mehr Fehlgeburten haben [78, 79]. Weitere nicht-reproduktive Auswirkungen sind metabolische Veränderungen wie Adipositas, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, Dyslipidämie mit erhöhtem Risiko für Cardiovasculärerkrankungen und Diabetes Typ 2 [73, 74, 80]. Die PCOS-Pathophysiologie ist komplex und weitestgehend unbekannt. Genetische Faktoren und Umwelteinflüsse, z. B. Übergewicht, könnten hormonelle Veränderungen bedingen, die ein Ungleichgewicht von Androgenen und Insulin bedingen, welche Effekte auf reproduktive und metabolische Prozesse haben könnten [75, 78, 79]. Ein charakteristisches Merkmal der Patientinnen sind polycystische Ovarien [76, 77]. Es kommt zu einer Akkumulation kleiner antraler Follikel im ovariellen Cortex. Durch fehlreguliertes Follikelwachstum kommt es zum Follikelarrest und die Selektion eines dominanten Follikels ist gestört [79-81]. Ein bedeutender Faktor ist hierbei wahr-

scheinlich die Hyperandrogenämie, aber auch die Hyperinsulinämie könnte bedeutsam sein. Durch den Androgenüberschuss ist das Gleichgewicht zwischen Androgenen, AMH (Anti-Müller-Hormon) und FSH gestört [80, 81]. Besonders Frauen mit PCOS entwickeln während ART-Behandlung OHSS [45, 69, 70]. Um dieses Risiko auszuschließen, bietet sich für solche Frauen die IVM an, bei der unreife Oocyten entnommen werden und deshalb nicht hormonell behandelt werden muss [45, 70, 82]. Weitere Vorteile der IVM sind geringere Belastungen und Kosten [44, 82, 83].

1.7.3 Intracytoplasmatische morphologisch selektierte Spermieninjektion (IMSI)

Da mittels ICSI nur eine Schwangerschaftsrate von 30% je Zyklus erreicht wird, war man bestrebt die Methode zu verbessern, was zur Entwicklung der MSOME (motile sperm organelle morphology examination) führte, die für die IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) verwendet wird [84]. Für diese Methode werden strengere Kriterien zur Beurteilung von Spermien verwendet als bei regulärer ICSI [85]. Während für ICSI die Spermienmorphologie mikroskopisch unter 400x Vergrößerung beurteilt wird, wird für IMSI eine 6000x Vergrößerung verwendet, die neben der regulären Beurteilung der Spermienmorphologie auch das Erkennen von Vakuolen im Spermienkopf ermöglicht [84, 85].

Solche Vakuolen im Spermienkopf wurden sowohl in fertilen als auch in infertilen Männern gefunden, aber Herkunft und Entstehungsmechanismen sind unbekannt [86-88]. Oftmals können multiple Vakuolen innerhalb eines Spermatozoons detektiert werden [86]. Im Rind wurde gezeigt, dass Spermien mit Kernvakuolen schlecht an die Zona pellucida von Oocyten binden und dabei zusätzlich Probleme zeigen diese zu penetrieren [89]. Auch wenn diese Vakuolen eine verbreitete Struktur humaner Spermien sind, konnte dennoch gezeigt werden, dass bei schlechter Spermienmorphologie die relative Vakuolengröße zunimmt [87, 88]. Große Kernvakuolen (large nuclear vesicles, LNVs) sind hingegen selten und nicht als normal anzusehen, im Gegensatz zu den normal vorkommenden kleinen Vakuolen [87, 90]. Der Anteil Vakuolen-tragender Spermien sowie die Anzahl an Spermien mit LNVs steigt mit zunehmendem Alter [91, 92]. Beim Vergleich von Spermien mit und ohne LNVs zeigten sich ähnliche Implantationsraten, aber geringere Schwangerschafts- und höhere

Abortraten, wenn das Spermium eine LNV enthielt [90]. Für humane Spermatozoen konnte eine Verbindung zwischen LNVs und abnormer Chromatinkondensation und Chromatinimmaturität gezeigt werden [86, 93-96]. Hinsichtlich des Einflusses von LNVs auf DNA-Fragmentierung sind die Ergebnisse bisheriger Studien widersprüchlich. Dabei zeigten manche Studien eine Zunahme der DNA-Fragmentierung [93, 97, 98], während andere Studien diese Ergebnisse nicht bestätigten [87, 95]. Verschiedene Studien berichteten zunächst, dass mittels IMSI bessere Spermien selektiert würden und Schwangerschaftsraten anstiegen, während Abortraten abnahmen [84, 99-101]. Eine aktuellere Bewertung konnte jedoch keinen Hinweis darauf erbringen, dass IMSI besser als ICSI ist in Hinblick auf Fehl- oder Lebendgeburten [43].

1.8 ART und Imprinting

Seit Einführung der IVF im Jahr 1978 sind weltweit mehr als 4 Millionen Kinder mittels IVF gezeugt worden und jährlich werden weltweit mehr als 200 000 ART-gezeugte Kinder geboren [102-104]. Durch IVF / ICSI gezeugte Kinder zeigen häufiger intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR, intrauterine growth restriction), Frühgeburtlichkeit, ein geringeres Geburtsgewicht und geringere Körperlänge zum Zeitpunkt der Geburt als spontan empfangene Kinder. In ART-Kindern zeigen sich außerdem häufiger als in natürlich gezeugten Kindern seltene Imprinting-Erkrankungen [104-106]. Der Zusammenhang zwischen ART und Imprinting-Erkrankungen ist bisher nicht endgültig geklärt, aber ein erhöhtes Auftreten von BWS, AS und SRS, nicht jedoch PWS, ist zu beobachten [107].

ART erfolgt zu einem Zeitpunkt zu dem, während der Gametogenese und frühen embryonalen Entwicklung, die Methylierung der parentalen bzw. des embryonalen Genoms reprogrammiert wird (siehe Abbildung 1-7). Es ist nicht auszuschließen, dass die verschiedenen angewandten Techniken, wie hormonell induzierte Superovulation, IVF / ICSI oder Embryokultur, einen Einfluss auf diese epigenetische Reprogrammierung haben könnten, da sie das Epigenom einem externen Stress aussetzen [102, 104, 106, 107].

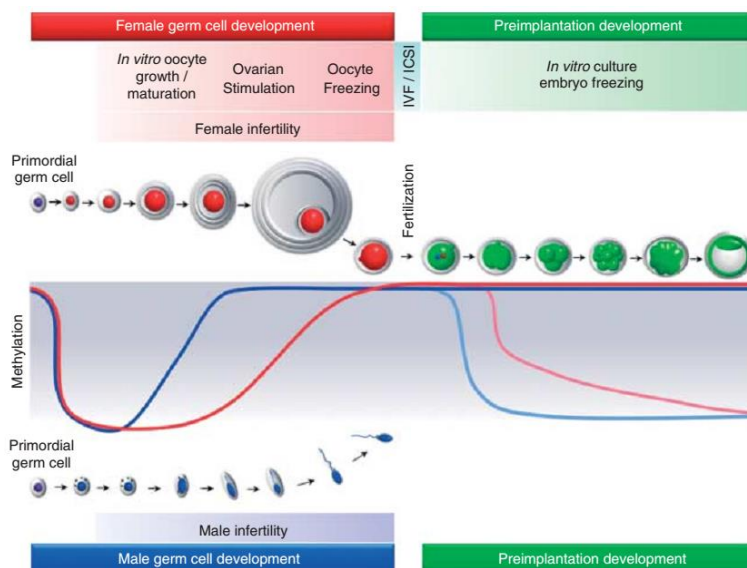


Abbildung 1-7: Epigenetische Reprogrammierung und ART.

In den paternalen Keimzellen ist das Imprinting bereits etabliert, wenn die Spermien für IVF / ICSI eingesetzt werden. Maternale Imprints werden hingegen in wachsenden Oocyten etabliert. IVM bzw. hormonell induzierte Superovulation finden ebenfalls zu diesem Zeitpunkt statt und könnten somit Einfluss auf die Imprint-Etablierung nehmen. Nach der Befruchtung erfolgt im Embryo aktive Demethylierung des paternalen Genoms und passive Demethylierung des maternalen Genoms. Die *In-vitro*-Embryokultur könnte einen externen Stressfaktor darstellen, durch den es zur Entstehung epigenetischer Defekte kommen könnte. (Abbildung aus [104]).

Patienten in ART-Behandlung zeigen eine geringe Fertilitätsrate, eine erhöhte Schwangerschaftsverlustrate und erhöhtes parentales Alter. Diese Faktoren sind assoziiert mit verschiedenen fetalen und neonatalen Abnormalitäten [107]. Ein erhöhtes maternales Alter (> 35 Jahre) reduziert Fertilität, da sowohl die Oocytenreserve als auch die Oocytenqualität verringert ist [104]. In verschiedenen Studien zum Vergleich von ART-Kindern und natürlich gezeugten Kindern wurde beobachtet, dass Mütter der ART-Gruppe zum Zeitpunkt der Schwangerschaft oftmals signifikant älter waren als die Normalbevölkerung [104, 105, 108].

Epimutationen sind häufiger Ursache für BWS (50%) und SRS (40%) als für PWS oder AS (je 2 bis 5%) [107, 109]. Eine Studie der japanischen Bevölkerung zeigte, dass die Häufigkeit für AS und PWS in ART-Nachkommenschaft gleich der der Normalbevölkerung war, während BWS und SRS in ART-Kindern häufiger auftrat [107]. Verschiedene Studien bei denen Methylierungsmuster von mit Imprinting-Erkrankungen assoziierten DMRs untersucht wurden, zeigten dass die Imprints sehr stabil sind zwischen ART-Kindern und natürlich gezeugten Kindern und dass IVF / ICSI keinen Einfluss auf eine Erhöhung der Methylierungsvariation hat [102, 105, 110, 111]. ART, d. h. IVF / ICSI, scheint nicht assoziiert zu sein mit erhöhten epigeneti-

schen Störungen. Die höhere Prävalenz für BWS ist eher durch die parentale Infertilität zu erklären, als durch den Einsatz von ART [103]. Das relative Risiko für BWS ist in ART-Kindern zwar erhöht, das absolute Risiko für BWS nach ART ist mit $< 1\%$ jedoch gering [112]. Mütter, deren Kinder BWS oder AS entwickelten, hatten ein höheres Alter zum Zeitpunkt der Schwangerschaft im Vergleich zur Gesamtbevölkerung [104]. In subfertilen Paaren, die mit oder ohne den Einsatz von ART Nachwuchs bekamen, zeigte sich für beide Gruppen dasselbe relative Risiko für BWS und AS. Dies wiederum bedeutet, dass die erhöhte Prävalenz von Imprinting-Erkrankungen nicht durch ART, sondern durch die beeinträchtigte Fertilität zu erklären ist [104, 113]. Eine weitere Studie verglich alle in einem Zeitraum von 20 Jahren in den Niederlanden gezeugten 83 818 ART-Kinder mit den im selben Zeitraum über 4 Millionen natürlich gezeugten Kindern, hinsichtlich der Häufigkeit der Imprinting-Erkrankungen BWS, PWS und AS. Auch wenn es zunächst scheinbar eine signifikante Assoziation zwischen IVF / ICSI und BWS gab, blieb diese unter Berücksichtigung der Fertilitätsproblematik der Eltern nicht bestehen, woraus man schließen kann, dass nicht die Technik selbst ursächlich ist, sondern der Infertilitätshintergrund der Eltern [108, 114]. Insbesondere für PWS konnte dabei eine signifikante Assoziation zwischen Fertilitätsproblemen und der Erkrankung selbst hergestellt werden, nicht jedoch für PWS und ART [108]. Für AS kann ebenfalls keine Assoziation zwischen ART und Krankheit erkannt werden, allerdings gibt es eine Assoziation zwischen Fertilitätsproblemen und AS [114]. Untersuchungen zu SRS zeigten eine Assoziation zu ART, wobei die Anzahl bisher bekannter Fälle jedoch gering ist. Dieser Zusammenhang zwischen ART und SRS kann allerdings dadurch erklärt werden, dass männliche Infertilität in Verbindung steht zu fehlerhaften Imprints und diese epigenetisch aberranten Methylierungsmuster eines Spermiums mittels IVF / ICSI auf den Nachwuchs übertragen werden können. Die Technik selbst ist nicht ursächlich für die Entstehung aberranter Methylierung im Embryo, weil zum Zeitpunkt von IVF / ICSI die paternalen Imprints bereits etabliert sind [104, 106, 109, 114]. Eine Untersuchung zu IUGR, bei der sowohl geprägte Gene als auch REs untersucht wurden, zeigte keine Assoziation zwischen IUGR oder Frühgeburtlichkeit und Methylierungsdefekten. Die Methylierung und Expression geprägter Gene war stabil und auch die Methylierung der REs war normal. ART erhöht also nicht die Methylierungsvariation. IUGR und Frühgeburtlichkeit können nicht mit ART assoziiert werden [115].

Maternale Imprints werden während der postnatalen Wachstumsphase der Oocyten etabliert [116]. Zu diesem Zeitpunkt erfolgen auch IVM oder hormonell induzierte Superovulation. Letztere steht in Verbindung zu in ART-Kindern auftretendem BWS und AS. Auffällig ist dabei, dass in fast allen untersuchten ART-bedingten BWS-Fällen eine Hypomethylierung am ICR der KCNQ1-Domäne des maternalen Allels vorliegt, ein Defekt der in sporadischen BWS-Patienten nur in 50% der Fälle auftritt [116]. Hypomethylierung des maternalen Allels ist auch in ART-AS-Fällen zu beobachten [106]. Des Weiteren sind BWS- und AS-Fälle bekannt, in denen ovarielle Stimulation die einzige angewandte ART-Prozedur war [117, 118]. Verschiedene Tierstudien, bei denen der Einfluss von Infertilität ausgeschlossen wurde, zeigten, dass induzierte Ovulation per se ein Störfaktor ist. Die Oocytenqualität ist beeinträchtigt, embryonales und fetales Wachstum sind verzögert und DNA-Methylierung und Expression in Oocyten sowie Embryo und Plazenta verändert. Ähnliche Veränderungen konnten im Menschen beobachtet werden [106, 118]. Imprint-Etablierung in Oocyten sowie die Aufrechterhaltung im frühen Embryo wird in einer dosisabhängigen Art und Weise durch Superovulation gestört [33, 104, 106, 117-120]. Durch die Hormonbehandlung könnte außerdem das Follikelwachstum beschleunigt werden, wodurch die Oocyte gezwungen wird schneller heranzureifen [118].

IVM umgeht die Problematik der Superovulation, indem der Frau ohne vorherige Hormongabe unreife Oocyten entnommen und erst *in vitro* gereift werden. Seit Einführung der IVM im Jahr 1991 sind weltweit geschätzt 2500 bis 3000 Kinder geboren worden [44, 121]. Bisher zur Gesundheit von IVM-Kindern erhobene Studien zeigen, dass bei IVM Schwangerschaftsraten niedriger und Fehlgeburtenraten höher sind als mit IVF, allerdings entsprechen Gestationsalter und Geburtsgewicht, im Gegensatz zu IVF / ICSI, dem der normalen Gesamtbevölkerung [83]. Des Weiteren konnten bei IVM-Kindern bisher keine kongenitalen Malformationen festgestellt werden. Auch hinsichtlich Wachstum und Entwicklung scheint es keine Unterschiede zu natürlich gezeugten Kindern zu geben [83, 116, 121]. Insgesamt geben die bisher verfügbaren Daten ein positives Bild, allerdings sind die Studien begrenzt [83, 116, 121]. Inwieweit IVM die Etablierung von Imprints während des Oocytenwachstums beeinflusst, ist nicht eindeutig geklärt und bisherige Ergebnisse sind teils widersprüchlich. Bisher durchgeführte Methylierungsanalysen humaner Oocyten wurden teils an bedingt geeignetem Material durchgeführt, indem Oocyten von geringer Qualität verwendet wurden, die schon auf die standardmäßige COS nicht reagiert hatten und erst im

Nachhinein einer IVM unterzogen wurden [116]. Dies erklärt weshalb einerseits Methylierungsänderungen nach IVM detektiert wurden [122, 123], dies in anderen Studien aber nicht bestätigt werden konnte [116, 124, 125]. Auch hinsichtlich des Etablierungszeitpunktes unterschiedlicher Imprints sind die vorhandenen Studien widersprüchlich, z. B. hinsichtlich des *SNRPN*-Imprints [126, 127] oder des *KvDMR1*-Imprints [116, 123, 124]. Insgesamt deutet die Mehrheit der Studien jedoch darauf hin, dass im Menschen, wie auch in der Maus, die Imprint-Etablierung noch vor der Befruchtung abgeschlossen ist [116]. Die beobachteten unterschiedlichen Methylierungsmuster von IVM und nicht-IVM-Oocyten könnten nicht nur durch geringe Oocytenqualität erklärt werden, sondern auch durch die COS, indem diese unreife Oocyten rekrutiert, die nicht fähig sind ihre Imprints vollständig zu etablieren [116, 119, 120]. Auch im Tiermodell (Maus, Rind) zeigen *In-vitro*-Follikelkulturmodelle insgesamt ein positives Bild hinsichtlich der Imprint-Etablierung. Aber auch hier zeigt sich, dass verschiedene Kulturmedien involviert sein können in die Generierung abnormer Imprints [116]. Neben schlechter Oocytenqualität oder Einfluss des Kulturmediums, könnten beobachtete abnorme Methylierungsmuster auch durch die zugrunde liegende Infertilität der Frau oder durch erhöhtes Alter verursacht worden sein [116]. Inwiefern IVM eventuell zu Imprint-Änderungen führen könnte, ist bisher nicht abschließend geklärt.

1.9 Vorstellung der in dieser Arbeit untersuchten Gene

1.9.1 *hGTL2*

GTL2 kodiert ein RNA-Transkript [27]. *MEG3* (maternally expressed gene 3) ist das humane Ortholog des Maus *Gtl2*-Gens (gene trap locus 2) [37, 39, 128]. Das humane geprägte *DLK1-MEG3*-Cluster ist auf Chromosom 14q32.2 lokalisiert und in Abbildung 1-8 dargestellt [37, 38, 128]. Der Locus enthält mehrere maternal und paternal geprägte Gene und ist 837 kb lang [27, 128]. Das Cluster enthält 3 paternal exprimierte proteinkodierende Gene (*DLK1*, *RTL1*, *DIO3*) sowie eine Vielzahl maternal exprimierter ncRNAs, darunter wenigstens drei lncRNAs (*MEG3*, *MEG8*, *RTL1as*), aber auch kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs) und Mikro-RNAs (miRNAs) [37-39,

128]. Das *MEG3*-Gen ist 35 kb lang und besteht aus 10 Exons [128]. Zur Regulation besitzt das Cluster zwei DMRs: die maternal vererbte *cis*-regulatorische intergenische gDMR (IG-DMR) und die nach der Befruchtung etablierte sekundäre *MEG3*-DMR [37, 38, 128]. Die IG-DMR ist eine konservierte (Maus, Mensch, Schaf) 8 kb lange CGI-assoziierte Tandem Repeat-Region, 13 kb upstream des *MEG3*-Promotors [27, 39, 128]. Die *MEG3*-DMR überlappt mit dem *MEG3*-Promotor [128]. Paternal sind beide DMRs hypermethyliert, maternal hypomethyliert [38, 39]. Maus-experimente zeigen die Bedeutung der IG-DMR als *cis*-wirkenden Regulator. Die maternale Kopie ist essentiell für die Expression der ncRNAs und Repression paternaler Gene, während Methylierung der paternalen Kopie für die Expression paternaler Gene wichtig ist [39]. Deletionen der maternalen IG-DMR bewirken eine Paternalisierung der Region, d. h. Expression paternaler Gene vom maternalen Allel während maternale Gene fast nicht exprimiert werden, resultierend in einem Phänotyp vergleichbar der humanen patUPD14 [27, 37, 38]. Mikrodeletionen der paternalen IG-DMR stören den Imprinting-Status nicht. Epimutationen bedingen Maternalisierung, d. h. Expressionsverlust paternaler Gene mit resultierender Wachstumsminde rung [27, 37, 38]. Methylierungsanalysen von *GTL2* in verschiedenen Geweben zeigte, dass *GTL2* eine Relaxation der IG-DMR-Methylierung zeigt. In Gameten und direkt nach der Befruchtung bleiben die Methylierungsmuster streng aufrechterhalten, zur Unterscheidung der parentalen Allele. Ab dem 2-Zell-Embryonalstadium nimmt intermediäre Methylierung zu, d. h. die parentalen Allele sind nicht mehr vollständig methyliert oder unmethyliert. Diese Relaxation wurde in embryonalem Gewebe, extraembryonalen Gewebe des Trophoektoderms, Amniocyten und Blutproben von ICSI-Babies und Erwachsenen beobachtet [27].

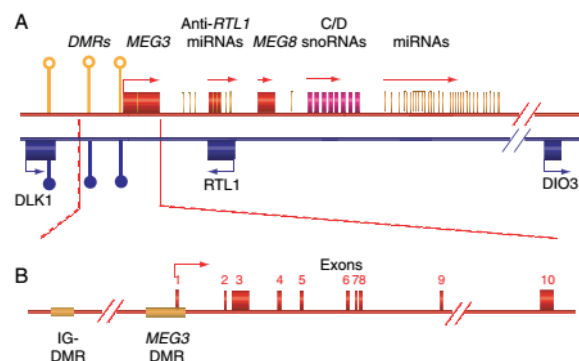


Abbildung 1-8: Der humane *DLK1-MEG3*-Locus auf Chromosom 14q32.2.

A: Das maternale Allel ist rot dargestellt, das paternale Allel blau. Der Locus enthält eine intergenische primäre gDMR (IG-DMR) und eine sekundäre sDMR (*MEG3*-DMR) zur Expressionsregulation. Methylierung an den

DMRs ist als gefülltes Lollipop dargestellt, ungefüllte Lollipops stehen für einen unmethylierten Zustand. B: Anordnung der DMRs und der *MEG3*-Exons. Abbildung aus [128].

Der *DLK1-MEG3*-Locus reguliert Wachstum und Entwicklung. Im Menschen wird *MEG3* in vielen Geweben exprimiert. Expressionsverlust zeigt sich in vielen verschiedenen humanen Tumoren [128]. *DLK1* kodiert für ein Transmembranprotein, welches involviert ist in zelluläre Differenzierung und Krebs [27]. In Mausexperimenten kann die Re-Expression von *MEG3* das Tumorstadium unterdrücken, da *MEG3* *p53* aktiviert, das wiederum selektiv seine Zielgene aktiviert [128].

1.9.2 *hPEG3*

Das humane paternal exprimierte Gen *PEG3* (paternally expressed gene 3) ist auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert und seine DMR trägt eine 4 kb große CGI [129, 130]. Die 500 kb Region der *PEG3*-Domäne ist in Säugetieren konserviert. Außerdem zeigt es besonders viele Tandem Repeats und CGIs über die gesamte *PEG3*-Region hinweg [130]. Das Protein ist eines der wenigen Produkte geprägter Gene, das direkt DNA-bindend wirkt. Diese Bindung erfolgt sequenzspezifisch, wobei *PEG3* am besten bindet wenn das gesamte Motiv seiner Consensus-Sequenz vorliegt, aber auch bestimmte Kernmotivnukleotide der Consensus-Sequenz ausreichend sind. Diese Flexibilität erlaubt *PEG3* verschiedene genomische Regionen zu binden [131].

PEG3 ist spezifisch für plazentale Säugetiere [129]. Es wird hauptsächlich während der Embryogenese exprimiert aber auch in adulten Geweben wie reproduktiven Organen, Muskeln und Gehirn [129, 132]. Mausexperimente zeigten die Bedeutung von *PEG3* für die Säugerreproduktion [129, 133]. *PEG3*-Mutationen beeinflussen zwei Typen von Genen: Gene des Lipidmetabolismus und plazentaspezifische Gene [129]. Außerdem beeinflusst es maternales Verhalten [133]. Heterozygote Maus-Weibchen zeigten eine reduzierte Anzahl reifer Oocyten und Nachkommen [129]. Des Weiteren zeigte sich eine partielle neonatale Lethalität, da heterozygote Nachkommen in Konkurrenz um Nahrung gegen ihre Wildtyp-Geschwister unterlagen [129]. Homozygote Deletion zeigte Wachstumsretardierung, Abnahme von Oxytocin-Neuronen im Hypothalamus und beeinträchtigte maternale Brutpflege, beeinträchtigtes männliches Geschlechtsverhalten, komplexe olfaktorische Defizite, abnormer Me-

tabolismus und Zunahme an Körperfett [132-135]. Durch die reduzierte Anzahl der Oxytocin-Neurone, welche in Nagern maternales Verhalten regulieren, lassen sich die beobachteten Defekte in der Laktation sowie die Verhaltensänderungen der Mütter erklären, die im Gegensatz zu genetisch normalen Müttern Probleme zeigten bei der Entwicklung des Nestbauverhaltens und weiterem Brutpflegeverhalten [133-135]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Mütter schon während der Schwangerschaft weniger Nahrung zu sich nahmen, was die Milchproduktion durch die fehlenden Fettreserven beeinträchtigte [134, 135].

Neben seiner Bedeutung für Embryonalentwicklung und Verhalten, sind *PEG3*-Fehlregulationen auch in die Tumorgenese involviert. Im Menschen findet man in vielen Patienten mit Ovarial- oder Brustkrebs sowie in Glioma-Tumoren eine Hypermethylierung [129]. In Krebszelllinien ist die *PEG3*-Expression erniedrigt [132]. *PEG3*, zusammen mit *PW1*, ist involviert in die Regulation der Myogenese über p53-, TNF α - und Bax-abhängige Signalwege [132]. *PEG3* / *PW1* reduzieren β -Catenin-Expression und inhibieren den WNT-Signalweg, was wichtig ist für die Entwicklung des Hypothalamus. Des Weiteren bewirken Inhibition des WNT-Signalweges und *PEG3* / *PW1* – vermittelte Inhibition der DNA-Synthese Apoptose in humanen Glioblastomazellen [132]. Außerdem zeigten SRS-Patienten eine Involvierung von *PEG3* [17].

1.9.3 *hLIT1*

Auf dem humanen Chromosom 11p15.5 findet sich ein weiteres Cluster geprägter Gene. Dieses Cluster wird über zwei unabhängige ICRs, das telomerische IC1 und das centromerische IC2, reguliert [136]. IC2 entspricht dem Promotor des geprägten nicht kodierenden Gens *KCNQ10T1*, auch *LIT1* oder *KvDMR1* genannt, und liegt antisense zum proteinkodierenden Gen *KCNQ1* [136-138]. Der *LIT1*-Promotor liegt maternal methyliert und paternal unmethyliert vor [137]. Das Transkript ist etwa 91 kb groß und im Nucleus lokalisiert, wo es durch Interaktion mit dem Chromatin die Expression geprägter Gene reguliert [137-139]. Dazu interagiert es in der Plazenta mit Polycomb repressiven Komplexen (PRCs) und der G9a-Histonmethyltransferase zur Organisation höherer Chromatinstrukturen [137, 138]. Die *LIT1*-lncRNA reguliert in *cis* die Repression der etwa 8 bis 10 maternal exprimierten Gene der etwa 1 Mb gro-

ßen centromerischen Region des paternalen Chromosoms [137, 138]. Auf dem maternalen Chromosom ist IC2 methyliert, wodurch *LIT1*-Expression verhindert und maternale Gene exprimiert werden können [136, 137]. *LIT1*-RNA wird bereits im 2-Zell-Stadium exprimiert und initiiert die Inaktivierung *cis*-liegender Gene im Präimplantations- und im frühen postimplantatorischen Embryonalstadium. Es ist involviert in die Generierung eines Nukleuskompartmentes, innerhalb dessen die stillgelegten Gene lokalisiert werden [139]. Epimutationen des 11p15.5-geprägten Locus sind involviert in BWS und SRS [136, 138]. Methylierungsdefekte am IC1 sind mit fehlregulierter Expression des *IGF2-H19*-Locus assoziiert. Maternal-spezifischer Methylierungsverlust am IC2, eine häufige BWS-Ursache, resultiert in biallelischer *LIT1*-Expression und Unterdrückung centromerischer Gene wie z. B. des Wachstuminhibitors *CDKN1C* [136]. Des Weiteren tritt bei BWS-Patienten häufig eine UPD der 11p15.5-Region auf, wohingegen Mikrodeletionen oder Duplikationen selten sind. Eine *in cis*-Duplikation des gesamten 11p15.5-Clusters, bei der das Imprinting aufrecht erhalten bleibt, kann zum SRS-Phänotyp führen [136].

1.9.4 *hSNRPN*

SNRPN steht für small nucleolar ribonucleoprotein polypeptide N. Die humane *SNURF-SNRPN*-Region ist auf Chromosom 15q11.2 lokalisiert. Diese geprägte Region führt je nach Fehlregulation zu PWS oder AS [17, 20, 33, 140, 141]. Der Locus ist maternal geprägt und Verlust des paternalen Allels resultiert in PWS [140, 141]. Das 3'-Ende des Transkripts enthält mehrere evolutionär konservierte C/D-Box snoRNAs [140, 141]. Diese sind kurze ncRNAs, die zusammen mit bestimmten Proteinen snoRNPs (small nucleolar ribonucleoprotein particle) bilden und in alternatives Spleißen involviert sind [141]. Die snoRNAs des *SNURF-SNRPN*-Locus zeigen gewebespezifische Expression [141]. So wird *HBII-52* nur im Gehirn exprimiert. Es reguliert alternatives Spleißen des Serotoninrezeptors 5-HT_{2C}. Da in PWS-Patienten kein *HBII-52* vorhanden ist, kommt es zur Fehlregulation der mRNA-Isoformen des Serotoninrezeptors 5-HT_{2C}. Knock-out-Mäuse dieses Serotoninrezeptors zeigen einen Phänotyp der dem klinischen Erscheinungsbild von PWS sehr ähnlich ist [141]. Ursache für PWS ist in 70% der Fälle eine Chromosom 15 de novo Mikrodeletion, die das gesamte geprägte Cluster einschließt, und in 29% der Fälle eine maternale

UPD15, durch meiotische Nondisjunktion und anschließenden Verlust der paternalen Kopie des Chromosoms 15. Nur etwa 1% der PWS-Fälle ist auf Epimutationen zurückzuführen [140].

1.9.5 Pluripotenzgene *hNANOG* und *hOCT4*

NANOG und *OCT4* sind Pluripotenzgene. Die Transkriptionsfaktoren sind unter anderem an Etablierung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen beteiligt [142]. Sie wirken über Repression von Entwicklungsgenen und Modulation ihrer eigenen Expression, indem sie gegenseitig an den Promotor des jeweilig anderen Gens binden oder indem jedes selbst an seinen eigenen Promotor bindet [142, 143]. Methylierungsanalysen der Promotorregionen von *NANOG* und *OCT4* ergaben, dass beide in humanen Spermien methyliert vorliegen, während sie in humanen Oocyten unmethyliert sind. Allerdings zeigte sich, dass Oocyten infertiler Frauen im Vergleich zu Oocyten fertiler Frauen signifikant öfter hypermethyliert sind [144]. Eine ähnliche Analyse, bei der die Promotormethylierung von *NANOG* und *OCT4* in Spermien fertiler und infertiler Männer mit veränderter Protamin P1:P2-Ratio untersucht wurden, zeigte keinen Unterschied [145].

NANOG ist auf Chromosom 12p13.31 lokalisiert und von besonderer Bedeutung für eine normale Säugarentwicklung, da *NANOG* in die Spezifizierung der inneren Zellmasse des Embryos involviert ist [142]. Seine Orthologe sind in Vertebraten konserviert [142]. *NANOG* tritt, aufgrund eines alternativen Promotors und alternativen Spleißens, in drei verschiedenen Isoformen auf. Posttranslationelle Modifikationen regulieren seine Funktionen und Eigenschaften wie transkriptionelle Aktivität, DNA-Bindung, Cofaktorfunktion, subzelluläre Lokalisation und Proteinstabilität [142]. Es wirkt im Nukleus als Transkriptionsfaktor durch Promotorenbindung und Regulation, indem *NANOG* direkt oder indirekt assoziiert ist mit transkriptionellen Aktivatoren, Corepressoren und Chromatin-remodellierenden Komplexen [146]. *NANOG*-Expression selbst wird auf epigenetischer Ebene über Chromatinmodifizierer wie Histoneacetyltransferasen (HATs) oder HDACs reguliert, welche reprimierend wirken, zusammen mit *SOX2* allerdings aktivierende Wirkung zeigen [142]. Humanes *NANOG* bildet ein Homodimer. Da die dafür nötigen Aminosäuren zwischen Mensch

und Maus konserviert sind, scheint diese Fähigkeit der Homodimerbildung bedeutsam für seine Funktion zu sein [146].

OCT4, lokalisiert auf Chromosom 6p21.31, ist ein Schlüsselfaktor der Präimplantationsentwicklung eines Embryos. Es induziert und reguliert Pluripotenz und erhält sie aufrecht. Des Weiteren reguliert es frühe Differenzierungsprozesse, unter anderem in der Separation von Trophoektoderm und innerer Zellmasse und später in der Gastrulation [147]. Es wird in Oocyten während der Maturation und Ovulation exprimiert sowie im frühen Embryo und in den PGCs, nicht jedoch in adultem Gewebe. In Spermien wird *OCT4* nicht exprimiert [147, 148]. Durch seine beiden DNA-bindenden Domänen kann *OCT4* direkt regulatorische DNA-Regionen erkennen und binden [143, 147]. Auch für *OCT4* gibt es drei verschiedene Isoformen, wovon jedoch nur die Isoform *OCT4A* im Nukleus lokalisiert ist und Pluripotenz induzieren kann. Wie *NANOG* kann auch *OCT4* über posttranslatorische Modifikationen in seiner Funktion moduliert werden [147]. Die Interaktionspartner von *OCT4* können in verschiedene Kategorien unterteilt werden:

- Transkriptionsfaktoren aus dem Pluripotenznetzwerk, wie *NANOG* oder *SOX2*
- Chromatin-remodellierende Faktoren
- Komponenten verschiedener Signalwege
- Transkriptionelle Co-Aktivatoren und andere Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie
- Faktoren der DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Rekombination.

Zu den Zielgenen von *OCT4* gehören Haushaltsgene, entwicklungsregulatorische Gene und Gene der embryonalen Stammzellidentität, aber auch metabolische und immunologische Gene [148].

1.9.6 *hDNMT3Lo*

Die de novo Methyltransferasen *DNMT3A* und *DNMT3B* benötigen beide *DNMT3L* als Cofaktor [149, 150]. Orthologe für *DNMT3A* und *DNMT3B* sind weit verbreitet in eukaryotischen Spezies, während *DNMT3L* speziell in Säugetieren evolvierte [150, 151]. *DNMT3L* ist essentiell für die Etablierung von Imprints in Gameten und für eine

normale Spermatogenese, insbesondere die Meiose [152]. Es wird in wachsenden Oocyten im gleichen Ausmaß wie DNMT3A exprimiert. Außerdem wurden DNMT3L- und DNMT3A-Transkripte in reifen Oocyten nachgewiesen, wo sie eventuell als maternale Transkripte für die Embryonalentwicklung gelagert sind [152]. Entsprechend der unterschiedlichen Zeitpunkte zu denen in den Keimbahnen geschlechtsspezifische Imprints etabliert werden, zeigt auch die Expression der de novo DNMTs geschlechtsspezifische Unterschiede. In der männlichen Keimbahn beginnt die Imprint-Etablierung pränatal in Prospermatogonien und wird perinatal fortgesetzt, während in Oocyten die Imprint-Etablierung postnatal abläuft [152]. In Spermien und Oocyten werden von unterschiedlichen Promotoren unterschiedliche DNMT3L-Transkripte generiert [150]. *DNMT3L* wird epigenetisch reguliert. Im frühen Epiblast ist es stark exprimiert, wird aber ab Beginn der Gastrulation mittels DNA-Methylierung herunterreguliert und ist ab der Mid-Gastrulation nicht mehr detektierbar [153].

DNMT3L ist selbst kein aktives Enzym, aber indem es mit DNMT3A ein Dimer bildet, kann es die katalytische Aktivität von DNMT3A steigern [149, 150]. Indem DNMT3L mit anderen de novo DNMTs interagiert, erhöht es die Affinität dieser für den Methylgruppendonator SAM und die Enzyme verweilen länger an der DNA, da DNMT3L den DNMT-DNA-Komplex stabilisiert und deren Prozessivität steigert [150, 153].

In Mausexperimenten konnte durch Deletion konservierter Regionen von *Dnmt3l* dessen Bedeutung für den Organismus gezeigt werden. Männliche Mäuse werden durch homozygote *Dnmt3l*-Deletion steril, da sie keine meiotischen Spermatocyten besitzen. Sie zeigen einen Methylierungsverlust an TEs wie *IAPs* und *LINE1* und geprägte Gene, die ihr Imprint in der männlichen Keimbahn erhalten, zeigen fehlende Methylierung [149, 150]. Homozygote Weibchen sind zwar fertil, aber ihre Embryonen sterben noch in utero, wahrscheinlich bedingt durch den Imprinting-Verlust [149].

Für *DNMT3L* gibt es drei verschiedene keimbahnspezifische Promotoren:

- *DNMT3Ls* ist aktiv in embryonalen Stammzellen und im adulten Testis in den Prospermatogonien und spermatogonischen Stammzellen.
- *DNMT3Lat* wird im adulten Testis im späten Pachytänstadium in runden Spermatiden verwendet und führt zur Generierung drei verschiedener Transkripte, die alle an derselben TSS beginnen.

- *DNMT3Lo* ist ein separater Promotor, der im dritten Intron des benachbarten *Aire*-Gens liegt. Von diesem Promotor wird das einzige in Oocyten detektierbare Transkript generiert, welches entsprechend in knock-out Mäusen fehlt [149, 150].

DNMT3Lo und *DNMT3Ls* generieren beide Proteine ähnlicher Größe, während *DNMT3Lat*-Transkripte nicht kodierend sind [149]. *DNMT3Ls* ist unmethyliert in embryonalen Stammzellen, aber stark methyliert in differenzierten Geweben, wobei der Inaktivierungsprozess Ähnlichkeiten zur transkriptionellen Suppression keimzellspezifischer Gene zeigt und der Grad der Methylierung mit Zunahme der Differenzierung ansteigt [149]. Während in reifen Spermien eine teilweise Methylierung des *DNMT3Ls*-Promotors detektiert werden kann, ist er in wachsenden und reifen Oocyten fast vollständig methyliert [149]. Für das Oocytentranskript *DNMT3Lo* gibt es in den 500 bp upstream der TSS keine CpG-Stellen, die der Regulation dienen könnten. Allerdings liegt der *DNMT3Lo*-Promotor in einem Intron des benachbarten *AIRE*-Gens, welches durch eine starke CGI im *AIRE*-Promotor reguliert wird. Diese CGI liegt in Oocyten unmethyliert vor und könnte eventuell auch *DNMT3Lo* regulieren [149].

Die alternativen *DNMT3L*-Promotoren werden mit unterschiedlichen Methylierungszuständen an den Embryo vererbt. Die paternale Kopie des *DNMT3Lo*-Promotors ist methyliert, während für *DNMT3Ls* die maternale Kopie methyliert ist [150]. Diese parentalen Methylierungsunterschiede sind jedoch keine echten Imprints, da sie nicht während der epigenetischen Reprogrammierung erhalten bleiben [150].

1.10 Ziele dieser Arbeit

Da die Problematik der Infertilität zunimmt, gewinnt ART immer mehr an Bedeutung. Welche Faktoren dieser Infertilität zugrunde liegen, ist nicht immer geklärt. Insbesondere welche Rolle die Epigenetik dabei spielt, steht erst am Anfang der Aufklärung. Auch die Sicherheit von ART ist nicht endgültig geklärt.

Um infertilen Paaren ihren Kinderwunsch zu erfüllen, ist man bestrebt bisherige Methoden zu verbessern und Risiken zu minimieren. Dazu wurde IMSI etabliert, um

bestmögliche Spermien zu wählen und die Erfolgsquote künstlicher Befruchtung zu verbessern. Inwieweit sich IMSI-selektierte Spermien von ICSI-selektierten Spermien hinsichtlich ihres Epigenoms unterscheiden und welchen Einfluss im Spermienkopf vorkommende Vakuolen haben, ist bisher unbekannt. Deshalb wurden hier IMSI- und ICSI-selektierte Spermien analysiert und die Häufigkeit von Epimutationen verglichen. Außerdem wurden Spermien mit Vakuolen im Spermienkopf untersucht und mit Spermien ohne Vakuolen verglichen, um zu sehen ob die Anwesenheit dieser in Zusammenhang mit Epimutationen steht. Untersucht wurden, mit einem eigens dazu entwickelten Assay, die geprägten Gene *hGTL2*, *hLIT1* und *hPEG3*, welche alle mit Imprinting-Erkrankungen in Verbindung stehen.

Damit infertile Frauen mit erhöhtem OHSS-Risiko vor diesem geschützt werden, wurde die IVM entwickelt. Da IVM zeitgleich zur Imprint-Etablierung in wachsenden Oocyten erfolgt, ist es notwendig festzustellen, ob IVM die Imprint-Etablierung und Aufrechterhaltung negativ beeinflusst. Bisherige Studien sind widersprüchlich. Um dieser Frage nachzugehen, wurden einzelne humane IVM-Oocyten untersucht und mit *in vivo* gereiften Oocyten verglichen. Analysiert wurden mit dem hierfür entwickelten Assay vier geprägte Gene (*hLIT1*, *hPEG3*, *hSNRPN* und *hGTL2*) sowie die Pluripotenzgene *hNANOG* und *hOCT4* und die oocytenspezifische Variante *hDNMT3Lo*.

Eine weitere Frage dieser Arbeit war, wie sich normale Spermien von Spermien aus OAT-Patienten hinsichtlich der Häufigkeit von Epimutationen unterscheiden. Außerdem wurde überprüft, ob Spermien die zu einer Lebendgeburt geführt hatten und Spermien, mit denen keine Schwangerschaft erreicht werden konnte, einen epigenetischen Unterschied zeigen. Für diese Untersuchung wurden Assays für die geprägten Gene *hGTL2* und *hPEG3* sowie für die Pluripotenzgene *hNANOG* und *hOCT4* etabliert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-1: Verbrauchsmaterialien und Herstellerinformationen

Bezeichnung	Hersteller
Biosphere® Filterspitzen (0,1 – 1000µl)	SARSTEDT AG & Co. (Nürmbrecht, Germany)
Combitips für Multipipette: Combitips advanced Biopur sterile 0,2ml Combitips advanced 0,1ml Combitips advanced 1ml	Eppendorf (Hamburg, Germany)
DNA-ExitusPlus™	AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany)
Einmalhandschuhe	Carl Roth GmbH & CoKG (Karlsruhe, Germany)
Einmalspritzen steril, 5ml	CODAN Medical ApS (Denmark)
Glasröhren 15 ml zur Spermienaufreinigung	Nidacon International AB (Möln dal, Sweden)
Kanülen NEOJECT®, sterile Einmalkanülen Gr. 18 (0,45 x 23 mm)	DISPOMED WITT oHG (Gelnhausen, Germany)
KIMTECH® Science Präzisionstücher	A. Hartenstein (Würzburg-Versbach, Germany)
Multiply®-PCR-Platten 96 wells, PCR-performance tested (free of human DNA, DNase, RNase, PCR-inhibitors) und 8er-Deckelstreifen	SARSTEDT AG & Co. (Nürmbrecht, Germany)
PCR-Reaktionsgefäße, 8er-Ketten, PCR-performance tested (free of human DNA, DNase, RNase, PCR-inhibitors)	SARSTEDT AG & Co. (Nürmbrecht, Germany)
PCR-Reaktionsgefäßständer	A. Hartenstein (Würzburg-Versbach, Germany)
Reaktionsgefäße 1,5 / 2ml	Eppendorf (Hamburg, Germany), SARSTEDT AG & Co. (Nürmbrecht, Germany)
Reaktionsgefäße 15ml / 50ml	SARSTEDT AG & Co. (Nürmbrecht, Germany)
Reaktionsgefäßständer 1,5-2ml und 15-50ml Gefäße	A. Hartenstein (Würzburg-Versbach, Germany)
Terralin® Liquid zu Desinfektionszwecken	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Germany)
TipOne Graduated Filterspitzen (0,5 – 200µl)	StarLab (Hamburg, Germany)

2.1.2 Kits

Tabelle 2-2: Verwendete Kits und Herstellerinformationen

Bezeichnung	Hersteller
Agilent DNA 7500 Kit	Agilent Technologies (Waldbronn, Germany)
DNeasy Blood and Tissue Kit	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
EZ DNA Methylation-Direct™ Kit	Zymo Research Corporation (Irvine, USA)
GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
GS Junior Titanium PicoTiterPlate (PTP) Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
GS Junior Titanium Sequencing Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
HotStarTaq Mastermix Kit	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 2-3: Verwendete Reagenzien und Herstellerinformationen

Bezeichnung	Hersteller
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific (Schwerte, Germany)
10x PCR buffer with MgCl ₂	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
10x PCR buffer without MgCl ₂	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
10x PCR Rxn buffer	Invitrogen (Darmstadt, Germany)
Agencourt AMPure XP Beads	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld, Germany)
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Germany)
EpiTect® PCR Control DNA Set (100) Human Control DNAs	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
FastStart Taq DNA Polymerase (5U/µl)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
GeneRuler DNA Ladder Mix (0,5µg/µl)	Thermo Scientific (Schwerte, Germany)
MgCl ₂ (25mM stock solution)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
PCR Grade Nucleotide Mix (10mM each nucleotide)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
Primer	Metabion (Martinsried, Germany)
PureSperm® 40	Nidacon International AB (Möln dal, Sweden)
PureSperm® 80	Nidacon International AB (Möln dal, Sweden)
PyroMark® Annealing Buffer	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
PyroMark® Binding Buffer	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
PyroMark® Gold Q96 CDT Reagents	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
Streptavidin Sepharose™ High Performance	GE Healthcare BioSciences AB (Uppsala Sweden)

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 2-4: Chemikalien und Herstellerinformationen

Bezeichnung	Hersteller
Agarose peqGold Universal	peqLab (Erlangen, Germany)
β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS), M = 78,13 g/mol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany)
Ethanol absolut (EtOH; C ₂ H ₆ OH) ≥ 99,8% p.a.	Carl Roth GmbH & CoKG (Karlsruhe, Germany)
Ethidiumbromidlösung (EtBr) 1%ige Lösung in Wasser, 10mg/ml	Carl Roth GmbH & CoKG (Karlsruhe, Germany)
Ethylendiamintetraacetic acid (EDTA; C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈), M = 292,25 g/mol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany)
HD GreenPlus DNA stain	INTAS Science Imaging (Göttingen, Germany)
Natriumchlorid (NaCl), M = 58,44 g/mol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany)
Natriumdodecylsulfat (SDS, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S), M = 288,38 g/mol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany)
Natriumhydroxid (NaOH), M = 40,01 g/mol	Carl Roth GmbH & CoKG (Karlsruhe, Germany)
RedSafe DNA stain	CHEMBIO (Hertfordshire, United Kingdom)
Salzsäure (HCl)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany)
Tris ultrapure (C ₄ H ₁₁ NO ₃), M = 121,12 g/mol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany)

2.1.5 Geräte

Tabelle 2-5: Geräte und Herstellerinformationen

Bezeichnung	Hersteller
Bandelin Sonorex Ultraschallbad	Bandelin electronics (Berlin, Germany)
Bioanalyzer 2100	Agilent (Böblingen, Germany)
DNA Engine Tetrad 2 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Germany)
Gelelektrophoresekammern "Gene Mate"	StarLab (Hamburg, Germany)
Gelelektrophorese Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Germany)
Gel Imager	Intas Science Imager Instruments GmbH (Göttingen, Germany)
GS Junior	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
Magnetic Particle Collector (MPC)	Invitrogen (Darmstadt, Germany)
NanoDrop 2000	peqLab (Erlangen, Germany)
Pipetten Eppendorf research plus (0,1µl-1000µl)	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Pipette Eppendorf Multipipette® plus	Eppendorf (Hamburg, Germany)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Germany)
PyroMark® Q96 MD Vacuum Workstation System	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
PyroMark® Q96 Capillary / Reagent tips und Q96 Capillary Tip Holder	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
Pyrosequencer PyroMark® MD	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
Rotator SB3 Stuart	Bibby Scientific, VWR (Darmstadt, Germany)
TB2 Thermoblock	Biometra GmbH (Göttingen, Germany)
Thermoschüttler TS-100 20x 1,5ml TS-100 20x 2,0ml	peqLab (Erlangen, Germany)
UV-Bench AirClean 600 PCR Workstation	StarLab (Hamburg, Germany)
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. (New York, USA)
Waage EG4200-2NM	Kern&Sohn GmbH (Balingen, Germany)
Zentrifugen: Heraeus Multifuge X1R Heraeus Multifuge 3SR+ Heraeus Multifuge X3 Hettich Zentrifugen Rotanta 460 Hettich Zentrifugen Mikro 20 Mikrozentrifuge für 1,5-2ml Reaktionsgefäße bzw. 250µl PCR-Reaktionsgefäße PCR-Plattenzentrifuge Perfect Spin Tischzentrifuge Eppendorff Centrifuge 5424 Tischzentrifuge VWR Galaxy 16 DH	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA) Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Germany) Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Germany) A. Hartenstein (Würzburg-Versbach, Germany) peqLab (Erlangen, Germany) Eppendorf (Hamburg, Germany) VWR (Darmstadt, Germany)

2.1.6 Software

Tabelle 2-6: Verwendete Software und Online-Tools

Bezeichnung	Hersteller
Amplifyer zur Analyse von Daten aus Deep Bisulfite-Sequenzierungsläufen	Sven Rahmann (Universität Duisburg-Essen, Germany)
BiQ Analyzer zur Erstellung von Lollipop-Diagrammen	Max-Planck Institut für Informatik (Saarbrücken, Germany) http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/tools/MethylationDiagrams/index.php
BiSearch zur Lokalisation von Primern, Größenbestimmung von PCR-Produkten	http://bisearch.enzim.hu/?m=genompsearch
BisRecommendationRoche zur Analyse von Deep Bisulfite-Sequenzierungsläufen auf bisulfit-konvertierter DNA	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
ENSEMBL-Datenbank	http://www.ensembl.org/index.html
MethPrimer zur CpG-Insel-Vorhersage	University of California San Francisco (UCSF) (San Francisco, USA) http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi
Online p-Wert Kalkulator Fisher's Exact Test	http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm
PriDimerCheck zur Vorhersage möglicher Interaktionen / Dimerbildung zwischen verschiedenen während einer Multiplex-PCR verwendeten Primer	http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/primer_dimer.html
PyroMark® Q-CpG zur Pyrosequenzierung	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
PyroMark® Assay Design zum Primerdesign für Pyrosequenzierungs- und anderer Primer auf bisulfit-konvertierter DNA	QIAGEN Sciences Inc. (Hilden, Germany)
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
Statistikprogramm SPSS Version 22.0.0.0	IBM (Berlin, Germany)

2.2 Puffer und Lösungen

1x TE-Puffer

- 1 ml 1M Tris (pH 8)
- 0,2 ml 0,5M EDTA
- Ad 100 ml Aqua dest.

50x TAE-Puffer

- 242 g Tris
- 100 ml 0,5M EDTA (pH 8)
- 57,1 ml Essigsäure
- Ad 1 l Aqua dest.
- Autoklavieren

70% Ethanol

- 700 ml 100% EtOH
- Ad 1 l Aqua dest.

Denaturierungspuffer für Pyrosequenzierung

- 8 g NaOH
- Ad 1 l Aqua dest.

Elutionspuffer für DBS Library-AMPureBead-Aufreinigung

- 10% 10x PCR Rxn buffer (Invitrogen)
- 40% Ampuwa-Wasser
- 50% 1x TE-Puffer

MELT-Lösung für DBS

- 85 µl 10 M NaOH
- 5 ml H₂O

Waschpuffer für Pyrosequenzierung

- 1,2 g Tris
- Ad 1 l Aqua dest.
- pH ad 7,6

Zelllysispuffer zur DNA-Isolation aus Spermien

- 2 ml 0,5M EDTA (pH 8)
- 10 ml 5M NaCl
- 10 ml 1M Tris (pH 8)
- 10 ml 10% SDS (pH 7,2)
- 2 ml 100% β-Mercaptoethanol
- Ad 100 ml Aqua dest.

2.3 Primer

Sämtliche Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Biotinylierte Primer sowie sämtliche für Deep Bisulfite Sequencing (DBS) verwendeten Primer waren HPLC aufgereinigt. Alle anderen verwendeten Primer waren lediglich entsalzt. Um eine Konzentration der Primerstocklösungen von 100 pmol/µl zu erhalten, wurden die vom Hersteller angegebenen Mengen an entsalztem Wasser zugegeben. Anschließend wurde von allen Primern eine 1:10-Verdünnung für eine finale Konzentration von 10 pmol/µl (=10 µM) zu erhalten. Eine Ausnahme stellten die in Multiplex-PCRs verwendeten Primer dar, welche auf eine Konzentration von 33 µM verdünnt wurden.

Tabelle 2-7: Limiting Dilution-Untersuchung humaner Oocyten.

Primersequenzen, Produktlängen und Lokalisationen der analysierten geprägten Gene. Biotinylierte Primer sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Geprägte Gene	Primername	Sequenz 5'->3'	PCR-Produktlänge (bp)	Anzahl analysierter CpGs	Chromosom-lokalisation	Lokalisation Ensembl release 74 – December 2013
hGTL2	hGTL2 LD OF	GAATTATAGGGAATGATGGTGTA	188		Chr. 14	14:101275634-101275822
	hGTL2 LD OR	CCAAAATACTAACTACTCCTTAAACA				
	hGTL2CG4 A2 Bis IF	AGGGTTAGGAAGTTTAGTAGGTTA	150			14:101275645-101275795
	hGTL2CG4 A2 Bis IR Bio*	ACTACTCCTTAAACAAAAAACACATAAT				
	hGTL2CG4 A2 Bis Pyro	GTAGTAAATTAAGTGTATTAGAGA		5		
hPEG3	hPEG3 LD OF	GGTTGTTGATTGGTTAGTATAG	229		Chr. 19	19:57351942-57352171
	hPEG3 LD OR1	CACTCACCTCACCTCAATAC				
	hPEG3 IF	GGTGTAGAAGTTTGGGTAGTTG	153			19:57351944-57352097
	hPEG3 IR Bio*	CTCACCTCACCTCAATACTAC				
	hPEG3 Pyro S	TGT TTA TTT TGG GTT GGT		3		
hSNRPN	hSNRPN-OF Bis	GGGTTTTAGGGGTTTAGTAGT	337		Chr. 15	15:25199962-25200299
	hSNRPN-OR Bis	ACTCCAAATCCTAAAACTTAAAATATC				
	hSNRPN Bis F Bio*	AGGGAGTTGGGATTTTTGTATT	237			15:25200012-25200249
	hSNRPN Bis R	CCCAAATCTCTTAAAAAAAAC				
	hSNRPN Pyro1	ACACAACCTAACCTTACCC		3		
	hSNRPN Pyro 2	CCAACCTACCTCTAC		3		
hLIT1	hLIT1 OF	GGGAGAATAGTGTTGAGGAGTTT	621		Chr. 11	11:2720690-2721311
	hLIT1 OR	CCCTACTACCCCAATCAACAAATAA				
	hLIT1 IF	GGGGAGGATTAAGTTGAGAGGTA	201			11:2721110-2721311
	hLIT1 IR*	CCCTACTACCCCAATCAACAAATAA				
	hLIT1 Pyro	GGAGTTTTTTGGAGG		6		

Tabelle 2-8: Limiting Dilution-Untersuchung humaner Oocyten.

Primersequenzen, Produktlängen und Lokalisationen der analysierten nicht geprägten Gene. Biotinylierte Primer sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Nicht geprägte Gene	Primernamen	Sequenz 5'->3'	PCR-Produktlänge (bp)	Anzahl analysierter CpGs	Chromosomlokalisierung	Lokalisation Ensembl release 74 – December 2013
hOCT4	hOCT4 OF	AGAAGGATTGTTTTGGTTTAGTAGA	330		Chr.6	6:31138451-31138781
	hOCT4 OR	AACTACTCAACCCCTCTCT				
	hOCT4 IF	AAGTTTTTGTGGGGGATTTGTAT	185			6:31138482-31138667
	hOCT4 IR Bio*	CCACCCACTAACCTTAACCTCTA				
	hOCT4 Pyro 1	TGAGGTTTTGGAGGG		2		
hNANOG	hNANOG OF2	TAGAGTAATTTAGATTAGGTGGGGAAT	262		Chr. 12	12:7941607-7941869
	hNANOG OR2	TAACCAAATAATTTCAAACCTCAACTT				
	hNANOG IF 3	GGAATATGGTTTAATAGGAATGGGATAA	152			12:7941609-7941761
	hNANOG IR 4 Bio*	ACCAAATAATTTCAAACCTCAACTTCA				
	hNANOG Pyro S3	ATTTTTGTAATTTTAGTAAATTGGG		2		
hNANOG Pyro S4	TTTTAAAATTAAGAAAAAGGT		3			
hDNMT3Lo	hDNMT3Lo OF Bis	GGAAGTGAGAGTTTTTTGAGT	171		Chr. 21	21:45705510-45705681
	hDNMT3Lo-R Bis OR	ATCAAACCAAACCTCCC				
	hDNMT3Lo-IF2	GTTGTTTTGGTGGGTGAGTTA	111			21:45705570-45705681
	hDNMT3Lo-R Bis Bio*	ATCAAACCAAACCTCCC				
	hDNMT3lo Pyro 2	GTG GGT GAG TTA GGT TA		4		

Tabelle 2-9: Limiting Dilution-Untersuchung von IMSI-Spermien.

Primersequenzen, Produktlängen und Lokalisationen der analysierten geprägten Gene. Biotinylierte Primer sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Genname	Primernamen	Sequenz 5'->3'	PCR-Produktlänge (bp)	Anzahl analysierter CpGs	Chromosomlokalisierung	Lokalisation Ensembl release 75 – February 2014
hGTL2	hGTL2 LD OF	GAATTATAGGGAATGATGGTGTA	188		Chr. 14	14:101275634-101275822
	hGTL2 LD OR	CCAAAATACTAACTACTCCTTAAACA				
	hGTL2CG4 A2 Bis IF	AGGGTTAGGAAGTTTAGTAGGTTA	150			14:101275645-101275795
	hGTL2CG4 A2 Bis IR Bio*	ACTACTCCTTAAACAAAAAACACATAAT				
	hGTL2CG4 A2 Bis Pyro	GTAGTAAATTAAGTGTATTAGAGA		5		
hPEG3	hPEG3 LD OF	GGTTGTTGATTGGTTAGTATAG	229		Chr. 19	19:57351942-57352171
	hPEG3 LD OR1	CACTCACCTCACCTCAATAC				
	hPEG3 IF	GGTGTAGAAGTTTGGGTAGTTG	153			19:57351944-57352097
	hPEG3 IR Bio*	CTCACCTCACCTCAATACTAC				
	hPEG3 Pyro S	TGT TTA TTT TGG GTT GGT		3		
hLIT1	hLIT1 OF3N	GTTATTTTATATTTAGTTAGTGTTTTATG	306		Chr. 11	11:2721164-2721470
	hLIT1 OR3N	ACAAAATCTTACTAAAAAATCCCTAAA				
	hLIT1 IR Bio*	CTAAAAAATCCCTAAAAATC	295			11:2721175-2721470
	hLIT1 Pyro S	GGGGGTAGTYGGAG		2		
	hLIT1 Pyro S2	TGTYGTTTAATTAGTAGGTGGG		6		

Tabelle 2-10: Deep Bisulfite Sequenzierung-Untersuchung von Spermien.

Primersequenzen, Produktlängen und Lokalisationen der ersten genspezifischen Amplifikation. Violett dargestellt: Sequenz des Universal Tag A. Türkis dargestellt: Sequenz des Universal Tag B.

Genname	Primernamen	Sequenz 5'→3'	PCR-Produktlänge (bp)	Anzahl analysierter CpGs	Chromosomlokalisierung	Lokalisation Ensembl release 75 – February 2014
hGTL2	hGTL2 fw4 DBS	CTTGCTTCCTGGCACGAG GGGTG-TAAAAAGTTATTTGGGATTAG	347	8	14	14:101275633-101275945
	hGTL2 rv4 DBS	CAGGAAACAGCTATGAC ACCA-AAATACTAACTACTCCTTAAACA				
hPEG3	hPEG3 fw4 DBS	CTTGCTTCCTGGCACGAG GAGGTT-GTTGATTGGTTAGTATAGAAG	265	18	19	19:57351943-57352173
	hPEG3 rv4 DBS	CAGGAAACAGCTATGAC ACTCACCT-CACCTCAATACTAC				
hOCT4	hOCT4 fw3 DBS	CTTGCTTCCTGGCACGAG GGGGTTT-GGTGAAATGAGG	344	5	6	6:31138421-31138730
	hOCT4 rv3 DBS	CAGGAAACAGCTATGAC ACTCCACTACACTCCAATCTA				
hNANOG	hNANOG fw4 DBS	CTTGCTTCCTGGCACGAG GGAATAT-GGTTTAATAGGAATGGGATAA	313	8	12	12:7941483-7941761
	hNANOG rv4 DBS	CAGGAAACAGCTATGAC ACCTCTAC-CTCCCAAATTCAA				

Tabelle 2-11: Deep Bisulfite Sequenz-Untersuchung von Spermien.

Sequenzen für Primer der zweiten Amplifikation zur Zuteilung unterschiedlicher Multiplex-Identifizierer (MID) für die spätere barcode-spezifische Zuordnung der verschiedenen untersuchten Proben. Forward AUT-Primer bestehen aus einer 454 Titanium A-Sequenz (pink), gefolgt von einer key-Sequenz (grün) zur Detektion am GS Junior-Sequenziergerät, unterschiedlichen MID-Sequenzen (schwarz) und der Universal Tag A-Sequenz (violett). Reverse BUT-Primer bestehen aus einer 454 Titanium B-Sequenz (blau), key und MID-Sequenzen und der Universal Tag B-Sequenz (türkis).

MID	Sequenz 5'→3'
1	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ACGAGTGCGT CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ACGAGTGCGT CAGGAAACAGCTATGAC
2	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ACGCTCGACA CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ACGCTCGACA CAGGAAACAGCTATGAC
3	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG AGACGCACTC CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG AGACGCACTC CAGGAAACAGCTATGAC
4	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG AGCACTGTAG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG AGCACTGTAG CAGGAAACAGCTATGAC
5	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ATCAGACACG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ATCAGACACG CAGGAAACAGCTATGAC
6	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ATATCGCGAG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ATATCGCGAG CAGGAAACAGCTATGAC
7	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG CGTGTCTCTA CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG CGTGTCTCTA CAGGAAACAGCTATGAC
8	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG CTCGCGTGTC CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG CTCGCGTGTC CAGGAAACAGCTATGAC
9	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TAGTATCAGC CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TAGTATCAGC CAGGAAACAGCTATGAC
10	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TCTCTATGCG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TCTCTATGCG CAGGAAACAGCTATGAC
11	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TGATACGTCT CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TGATACGTCT CAGGAAACAGCTATGAC
12	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TACTGAGCTA CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TACTGAGCTA CAGGAAACAGCTATGAC
13	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG CATAGTAGTG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG CATAGTAGTG CAGGAAACAGCTATGAC

14	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG CGAGAGATAC CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG CGAGAGATAC CAGGAAACAGCTATGAC
15	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ATACGACGTA CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ATACGACGTA CAGGAAACAGCTATGAC
16	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TCACGTA CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TCACGTA CAGGAAACAGCTATGAC
17	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG CGTCTAGTAC CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG CGTCTAGTAC CAGGAAACAGCTATGAC
18	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TCTACGTAGC CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TCTACGTAGC CAGGAAACAGCTATGAC
19	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TGTACTACTC CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TGTACTACTC CAGGAAACAGCTATGAC
20	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ACGACTACAG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ACGACTACAG CAGGAAACAGCTATGAC
21	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG CGTAGACTAG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG CGTAGACTAG CAGGAAACAGCTATGAC
22	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TACGAGTATG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TACGAGTATG CAGGAAACAGCTATGAC
24	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TAGAGACGAG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TAGAGACGAG CAGGAAACAGCTATGAC
25	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG TCGTCGCTCG CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG TCGTCGCTCG CAGGAAACAGCTATGAC
26	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ACATACGCGT CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ACATACGCGT CAGGAAACAGCTATGAC
27	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ACGCGAGTAT CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ACGCGAGTAT CAGGAAACAGCTATGAC
28	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ACTACTATGT CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ACTACTATGT CAGGAAACAGCTATGAC
29	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG ACTGTACAGT CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG ACTGTACAGT CAGGAAACAGCTATGAC
30	AUT CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAG AGACTATACT CTTGCTTCCTGGCACGAG BUT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC TCAG AGACTATACT CAGGAAACAGCTATGAC

2.4 Biologisches Material

2.4.1 Spermienproben

Alle hier mittels Limiting Dilution (LD) oder Deep Bisulfite Sequencing (DBS) analysierten Spermienproben wurden am Kinderwunschzentrum Wiesbaden (Deutschland) gesammelt nach Einverständnis der Patienten bzw. der fertilen Donoren sowie Genehmigung des Ethikkomitees der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg.

2.4.1.1 Spermienproben für die Limiting Dilution-Studie

Die hier untersuchten Spermienproben wurden von 20 verschiedenen nachweislich fertilen Donoren gesammelt, um den Einflussfaktor Infertilität für die hier durchgeführten Untersuchungen auszuschließen. Die Spermienproben enthielten jeweils 11 Spermien, welche in 10 µl PBS-Puffer gesammelt wurden. Von jedem Donor wurden jeweils 2 Proben für die Testgruppe und 2 Proben für die Kontrollgruppe gesammelt. Die Spermien waren motil und wurden dem nativen Ejakulat entnommen. Für die IMSI+/+ Kontrollspermiengruppe wurden entsprechende IMSI-Kriterien angewandt, d. h. die Spermien wurden unter einem Mikroskop mit 6000x Vergrößerung selektiert und hatten weder eine abnorme Morphologie, noch Vakuolen im Spermienkopf. Für die ICSI Testgruppe wurden ICSI-Kriterien angewandt was bedeutet, dass die Spermien unter einem Mikroskop mit lediglich 400x Vergrößerung selektiert wurden. Diese ICSI-Spermien wiesen ebenfalls keine abnorme Morphologie auf. Vakuolen im Spermienkopf können jedoch bei dieser geringeren Vergrößerung am Mikroskop nicht detektiert und dementsprechend ihr Vorhandensein nicht ausgeschlossen werden. Die beiden anderen Testgruppen IMSI– und IMSI-/– wurden ebenfalls bei 6000x Vergrößerung ausgewählt. Für die Testgruppe IMSI– wurden Spermien gewählt, die klar erkennbare Vakuolen im Spermienkopf trugen, deren Morphologie jedoch ansonsten normal war. Die andere Testgruppe IMSI-/– wies abnorme Morphologie im Kopf- und Halsbereich auf und zeigte zudem oftmals Vakuolen. Insgesamt standen für die Untersuchung 880 Spermien zur Verfügung, davon 440 Spermien von 20 Do-

noren für die IMSI+/+ Gruppe, 220 Spermien von 10 Donoren für die IMSI– Gruppe und je 110 Spermien von je 5 Donoren für die Gruppen IMSI-/- und ICSI.

2.4.1.2 Spermienproben für Deep Bisulfite Sequencing

Die mittels DBS untersuchten Spermien stammten aus dem Swim-up des Ejakulats. Insgesamt wurden 54 verschiedene Proben untersucht, von denen 27 Proben von Patienten mit OAT-Syndrom und weitere 27 Proben von Patienten mit normalem Spermogramm stammten. Entsprechend der WHO-Kriterien von 2010 gelten für ein normales Spermogramm folgende in Tabelle 2-12 angegebenen unteren Referenzgrenzwerte [46]. Jede dieser beiden Gruppen war nochmals unterteilt in je eine Subgruppe von 13 Patienten, deren Spermien mittels ART zu einer Lebendgeburt geführt hatten, und je eine Subgruppe aus 14 Patienten, für die mittels ART keine Schwangerschaft etabliert werden konnte.

Tabelle 2-12: WHO-Kriterien (2010) der unteren Referenzgrenzwerte für ein normales Spermogramm.

Kriterium	Unterer Referenzgrenzwert WHO 2010
Ejakulatvolumen [ml]	≥ 1,5
Spermienkonzentration [$\times 10^6$ /ml]	≥ 15
Normale Morphologie [%]	≥ 4
Gesamtmotilität [%] (progressiv und nichtprogressiv)	≥ 40
Progressive Motilität [%]	≥ 32

Patienten mit OAT-Syndrom wiesen im Gegensatz zum normalen Spermogramm eine reduzierte Spermienkonzentration (Oligozoospermie), reduzierte Motilität (Asthenozoospermie) sowie eine reduzierte Anzahl an Spermatozoen normaler Morphologie (Teratozoospermie) auf. Die einzelnen Spermogrammwerte der verschiedenen hier untersuchten Spermienproben sind, zusammen mit der Information zum ART-Ausgang, in Tabelle 2-13 angegeben.

Tabelle 2-13: Spermogrammwerte der verschiedenen mittels DBS untersuchten Spermienproben.

N – Normozoospermie, O – OAT-Syndrom, L – Lebendgeburt, K – keine Schwangerschaft.

Gruppe	Probe	Volumen [ml]	Konzentration [$\times 10^6$ /ml]	Morphologie [% normal geformt]	Gesamtmotilität [%]	Progressiv motil [%]	Befund	ART-Ausgang
NL	1	2,8	92	18	55	53	N	L
	2	4,4	33	11	59	47	N	L
	3	6,5	38	11	58	49	N	L
	4	2,9	77	10	53	36	N	L
	5	3,4	52	5	48	47	N	L
	6	1,9	112	10	44	43	N	L
	7	3	25	8	65	52	N	L
	8	6	120	17	65	45	N	L
	9	2,5	70	15	55	40	N	L
	10	4	80	15	55	40	N	L
	11	5,5	41	13	60	45	N	L
	12	4	100	12	50	50	N	L
	13	2,5	130	12	70	40	N	L
NK	1	3	120	18	60	50	N	K
	2	3	150	18	60	45	N	K
	3	6,3	76	10	60	59	N	K
	4	3,6	46	10	55	49	N	K
	5	7	65	10	53	52	N	K
	6	3,8	35	10	65	48	N	K
	7	3,9	41	10	55	34	N	K
	8	2,1	57	8	46	45	N	K
	9	1,7	39	17	67	57	N	K
	10	2,5	61	15	49	48	N	K
	11	3,3	85	15	40	39	N	K
	12	3,3	162	15	43	42	N	K
	13	3	30	12	50	40	N	K
	14	3,4	15	11	54	41	N	K
OL	1	3,4	2	1	23	7	O	L
	2	2,5	5	4	31	21	O	L
	3	4	3	5	30	15	O	L
	4	4	12	5	25	10	O	L
	5	3,5	12	7	29	21	O	L
	6	2	11	5	30	15	O	L
	7	0,5	3	8	8	3	O	L
	8	3,5	4	1	15	5	O	L
	9	5,5	6	1	4	2	O	L
	10	3,5	9	3	11	2	O	L
	11	2	9	3	29	18	O	L
	12	2,5	11,8	2	38	32	O	L
	13	2	9	4	36	15	O	L
OK	1	4	3,2	1	6	6	O	K
	2	3	5	1	17	7	O	K
	3	4,5	2	3	32	22	O	K
	4	4,5	6	3	16	11	O	K
	5	3,1	10	3	30	20	O	K
	6	4	5	3	26	16	O	K
	7	6	3	3	21	9	O	K
	8	1,5	2,1	3	20	7	O	K
	9	2,3	8	1	29	7	O	K
	10	1	2	1	5	2	O	K
	11	4	14	1	10	5	O	K
	12	1,9	2,4	2	5	3	O	K
	13	2,8	11,9	2	6	5	O	K
	14	4	3	2	5	2	O	K

2.4.2 Oocytenproben

Die hier untersuchten Oocyten wurden von Patientinnen gesammelt, welche sich einer Fertilitätsbehandlung am Center für Reproduktive Medizin der UZ Brüssel (Belgien) unterzogen. Alle Patientinnen wurden vorher informiert und gaben ihre Zustimmung, ebenso wie das Instituts-Ethikkomitee. Sowohl Entnahme der COCs und IVM als auch die Gewinnung und Aufreinigung der zu untersuchenden Oocyten wurden alle am Center für Reproduktive Medizin der UZ Brüssel durchgeführt.

Für die IVM-Testgruppe standen insgesamt 90 Oocyten zur Verfügung. Zur Oocyten-gewinnung wurden den insgesamt 19 PCOS-Patientinnen zunächst ohne vorherige hCG-Behandlung (humanes Choriongonadotropin) unreife COCs entnommen, welche anschließend in einem IVM-Kulturmedium gereift wurden. Von den insgesamt 90 IVM-Oocyten konnten 15 reife MII-Stadium-Oocyten gewonnen werden, während 75 Oocyten trotz IVM-Behandlung unreif blieben, von denen 53 Oocyten im GV-Stadium und 22 im MI-Stadium vorlagen. Als Kontrollgruppe wurden 49 *in vivo* gereifte Oocyten untersucht, von denen 30 Oocyten unreif waren (29 GV-Oocyten und 1 MI-Oocyte) und 19 Oocyten reif (MII) vorlagen. Die Kontroll-Oocyten wurden entweder nach konventioneller COS für IVF / ICSI (31 Oocyten) oder nach Ovulationsinduktionsbehandlung (18 Oocyten) gewonnen. Die *in vivo* gereiften Oocyten stammten von insgesamt 7 Patientinnen, von denen wiederum 5 Frauen (von denen 37 der 49 Oocyten stammten) ebenfalls PCOS hatten. Das durchschnittliche Alter der Patientinnen der IVM-Gruppe betrug 28 (22-35) Jahre, während es in der Kontrollgruppe 30 (21-36) Jahre betrug. Genauere Informationen zur Oocyten-Patientenzuordnung sind in Tabelle 2-14 angegeben.

Tabelle 2-14: Oocyteninformationen und Patientenzuordnung.

Informationen zum Alter, AMH-Gehalt, PCOS und zusätzlich für *In-vivo*-Kontrollpatientinnen der Behandlungsart. Der AMH-Gehalt gibt Auskunft über den Grad der PCOS-Ausprägung und wurde mittels AMH Gen II ELISA (Beckman Coulter) am Center für Reproduktive Medizin der UZ Brüssel ermittelt. COH: kontrollierte Ovarienhyperstimulation. OI: Ovulationsinduktion.

Gruppe	Patient	Alter [Jahre]	AMH [$\mu\text{g/l}$]	PCOS Ja / Nein	Verfügbare Oocyten	Oocytenzuordnung für Auswertung	Behandlung
<i>in vivo</i>	1	29	7,1	Ja	14x unreif (GV); 5x reif (MII)	<i>in vivo</i> -Pat1-i-1 bis 10; m-24 bis 26	COH
	2	35	8,9	Ja	2x reif (MII)	<i>in vivo</i> -Pat2-m-27 und 28	OI
	3	35	-	Nein	1x unreif (GV) 10x reif (MII)	<i>in vivo</i> -Pat3-m-29 bis 36	OI
	4	30	1,8	Nein	1x reif (MII)	<i>in vivo</i> -Pat4-m-37	OI
	5	30	2,7	Ja	2x unreif (GV); 1x reif (MII)	<i>in vivo</i> -Pat5-i-11 und 12; m-38	OI
	6	36	6,8	Ja	1x unreif (GV)	<i>in vivo</i> -Pat6-i-13	OI
	7	21	4,4	Ja	12x unreif (11x GV, 1x MI)	<i>in vivo</i> -Pat7-i-14 bis 23	COH
IVM	1	30	7,7	Ja	7x unreif (GV)	IVM-Pat1-i-1 und 2	-
	2	30	7,9	Ja	6x unreif (MI)	IVM-Pat2-i-3 bis 7	-
	3	35	-	Ja	4x unreif (GV)	IVM-Pat3-i-8 und 9	-
	4	31	3,8	Ja	7x unreif (4x GV, 3x MI)	IVM-Pat4-i-10 bis 12	-
	5	35	5,6	Ja	4x unreif (2x GV, 2x MI)	IVM-Pat5-i-13 bis 15	-
	6	26	15,9	Ja	3x unreif (1x GV, 2x MI)	IVM-Pat6-i-16 bis 18	-
	7	27	6,0	Ja	7x unreif (6x GV, 1x MI)	IVM-Pat7-i-19 bis 24	-
	8	29	7,9	Ja	8x unreif (3x GV, 5x MI)	IVM-Pat8-i-25 bis 31	-
	9	25	9,3	Ja	4x unreif (2x GV, 2x MI); 1x reif (MII)	IVM-Pat9-i-32 bis 35; m-60	-
	10	31	8,6	Ja	6x unreif (5x GV, 1x MI)	IVM-Pat10-i-36 bis 41	-
	11	31	12,0	Ja	8x unreif (GV)	IVM-Pat11-i-42 bis 48	-
	12	22	15,4	Ja	4x unreif (GV)	IVM-Pat12-i-49 bis 52	-
	13	28	7,0	Ja	3x unreif (GV)	IVM-Pat13-i-52 bis 55	-
	14	24	5,2	Ja	4x unreif (GV)	IVM-Pat14-i-56 bis 59	-
	15	27	16,8	Ja	2x reif (MII)	IVM-Pat15-m-61 und 62	-
	16	29	10,0	Ja	2x reif (MII)	IVM-Pat16-m-63 und 64	-
	17	27	8,6	Ja	6x reif (MII)	IVM-Pat17-m-65 bis 67	-
	18	28	22,6	Ja	2x reif (MII)	IVM-Pat18-m-68 und 69	-
	19	27	11,2	Ja	2x reif (MII)	IVM-Pat19-m-70 und 71	-

2.4.2.1 *In-vitro*-Maturation und Oocytenaufreinigung für die anschließende Imprinting-Analyse

Für die hier untersuchten humanen Oocyten wurde die so genannte "genuine" (echte) IVM angewandt, bei der den Patientinnen unreife COCs aus kleinen antralen Follikeln entnommen werden nach vorhergehender minimaler Ovarialstimulation und ohne hCG-Behandlung, wie bereits von Ortega-Hrepich et al. beschrieben [154].

Gonadotropine wurden den Patientinnen für 3 Tage gegeben, entweder 3 Tage nach der Menstruation oder am Tag des Baseline-Scans (in anovulatorischen Patientinnen mit dünnem Baseline-Endometrium). Zwischen Tag 6 und 8 der Behandlung wurde jeweils ein zweiter Ultraschall-Scan durchgeführt. Sofern die Endometriumdicke > 5 mm betrug und keine Follikel mit einer Größe > 10 mm erkennbar waren, wurde eine Oocytenentnahme 42 h nach der letzten Gonadotropingabe vorbereitet. Die Patientinnen erhielten kein hCG-Triggerng, wodurch die gewonnenen COCs alle eine dichte Cumulus-Corona-Schicht zeigten und die enthaltenen Oocyten sich alle im GV-Stadium befanden. Die COCs wurden dann für 30-40 h im MediCult IVM System gereift und währenddessen mit rekombinanten FSH, hCG und humaner Albuminlösung behandelt [44].

Nach der IVM wurden die Oocyten aufgereinigt, indem die COCs kurz Cumulase ausgesetzt wurden. Die die Oocyte umgebenden Cumuluszellen wurden dann mechanisch mittels Auf- und Abpipettieren mit einer Denudationspipette entfernt. GV-Oocyten wurden in Gametenpuffer mit $50 \mu\text{M}$ IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) transferiert, um eine spontane Wiederaufnahme der Meiose zu verhindern, während MI- und MII-Oocyten in Gametenpuffer ohne IBMX überführt wurden. Die Oocyten wurden dann mehrmals (3-4x) in je $20 \mu\text{l}$ PBS gewaschen, um Kontamination mit eventuell noch vorhandenen Cumuluszellen zu verhindern, und anschließend wurde je eine Oocyte in $2 \mu\text{l}$ PBS in ein $0,5$ ml-Reaktionsgefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren [44]. Diese Aufreinigung war notwendig, um eine somatische Kontamination zu verhindern, welche eine Auswertung der Analyse einzelner Oocyten gestört hätte, da somatische Kontamination fälschlicherweise als Epimutation gedeutet werden könnte.

2.5 Methoden

2.5.1 Aufreinigung und DNA-Isolation aus Spermien

2.5.1.1 Aufreinigung von Spermienproben

Zur Aufreinigung der mittels DBS untersuchten Spermienproben wurden diese zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert, um die Proben zu homogenisieren. Mit den Reagenzien PureSperm® 40 und PureSperm® 80 wurden in sterilen Glasröhrchen Dichtegradienten vorgelegt. Bei PureSperm handelt es sich um eine kolloidale Silica-Suspension in isotonischer Salzlösung. Diese Art der Dichtegradientenaufreinigung dient der Separation und Aufreinigung humaner Spermienproben, wie sie auch in Fertilitätszentren bei ART Verwendung findet. Für ART dient diese Dichtegradientenaufreinigung dazu, immotile Spermien, tote Zellen und andere Verunreinigungen von motilen Spermien zu trennen (siehe Abbildung 2-1). Da die hier untersuchten Spermien schon aus dem Swim-Up entnommen worden waren, sollte es sich eigentlich schon um reine Proben handeln. Dennoch wurde die Aufreinigung durchgeführt, um sicher zu stellen, dass für die anschließende DNA-Isolation wirklich nur Spermien aber keine Kontaminationen durch eventuell andere vorhandene Zellen vorliegen, welche die Ergebnisse der anschließenden Untersuchungen verfälscht hätten.

Für den Dichtegradienten wurden in die Nidacon Glasröhrchen zunächst 2 ml PureSperm® 80 vorgelegt, auf welche dann vorsichtig weitere 2 ml PureSperm® 40 gegeben wurden. Je eine homogenisierte Spermienprobe wurde dann vorsichtig, um die verschiedenen Phasen nicht zu stören, auf je einen Gradienten gegeben. Pro Gradient wurden maximal 500 µl Spermienprobe geladen. In solchen Fällen, in denen mehr als 500 µl Spermienprobe zur Verfügung standen, wurden entsprechend mehrere Gradienten verwendet. Für die Separation wurde dann für 20 min bei 300 x g zentrifugiert. Um die Phasen nicht zu stören, wurde nach der Zentrifugation nicht abgebremst. Anschließend wurde in kreisenden Bewegungen der Überstand abgenommen, bis nur noch 4-6 mm PureSperm® 80 Überstand oberhalb des Pellets vorhanden waren bzw. im Falle sehr geringer Spermienkonzentrationen ohne erkennbares Pellet wurden 500 µl PureSperm® 80 Überstand gelassen. Dieser Überstand,

welcher die nun aufgereinigten Spermien enthielt, wurde dann in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt für die anschließende DNA-Isolation.

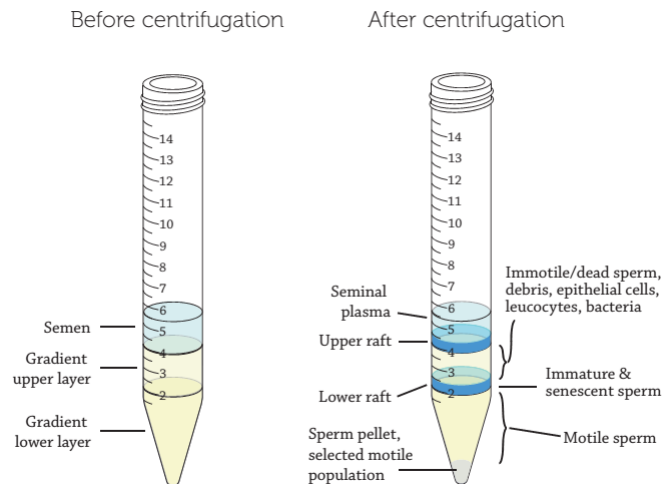


Abbildung 2-1: Dichtegradientenaufreinigung von Spermienproben.

Mittels Zentrifugation werden die einzelnen Bestandteile einer Spermienprobe über einen Dichtegradienten voneinander getrennt, wodurch motile Spermien aufgereinigt werden können. Immotile, tote und unreife Spermien und andere Zellen befinden sich in der oberen PureSperm® 40-Phase, während die gewünschten motilen Spermien sich in der unteren PureSperm® 80-Phase befinden. (Abbildungen von Nidacon, PureSperm® Density Gradient Preparation Protokoll).

2.5.1.2 DNA-Isolation aus aufgereinigten Spermienproben

Für die DNA-Isolation aus Spermien wurde der Überstand der Dichtegradientenaufreinigung mit 300 µl Zelllysispuffer und 100 µl Proteinase K versetzt und auf einem Thermomixer für 2 h bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden weitere 20 µl Proteinase K zugesetzt und weitere 2 h bei 56°C inkubiert. Danach wurden 400 µl AL-Puffer und 400 µl 100% Ethanol zugegeben und mittels vortexen gemischt. Für die anschließenden Schritte wurde das QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit entsprechend des beiliegenden Protokolls verwendet. Zunächst wurden 500 µl auf eine DNeasy-Säule gegeben und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt, bis das gesamte Reaktionsvolumen auf die Säule geladen war. Im Falle mehrerer Gradienten für ein und dieselbe Spermienprobe, wurde hier alles auf eine einzige Säule geladen. Nachdem die DNA auf die Säulenmatrix geladen wurde, wurde die Säule auf ein neues Sammelreaktionsgefäß überführt und es wurden 500 µl Waschpuffer AW1

zugegeben und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann wieder auf ein neues Sammelgefäß gesetzt und es wurden weitere 500 µl Waschpuffer AW2 zugegeben und 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde wieder auf ein neues Sammelgefäß gegeben und es wurde noch einmal für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um sämtliche eventuell noch vorhandenen Flüssigkeitsreste zu entfernen. Danach wurde die Säule auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und es wurden 100 µl Elutionspuffer AE zugegeben. Es wurde für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Um sämtliche DNA von der Säulenmatrix zu eluieren, wurde die Elution wiederholt und die Eluate anschließend zusammengeführt und am NanoDrop vermessen um die erhaltene DNA-Menge zu quantifizieren.

2.5.2 Bisulfitkonvertierung

Zur Untersuchung des Methylierungszustandes von DNA-Material ist die Standardmethode die Bisulfitkonvertierung von DNA. Durch die Behandlung mit Natriumbisulfit (NaHSO_3) werden nichtmethylierte Cytosine deaminiert und somit zu Uracil umgewandelt, wie in Abbildung 2-2 dargestellt ist.

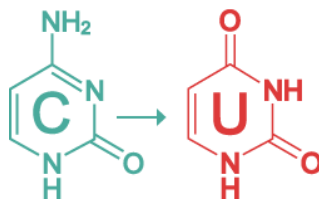


Abbildung 2-2: Konvertierung eines unmethylierten Cytosins.

Mittels Natriumbisulfit wird Cytosin durch Deaminierung in Uracil umgewandelt. (Abbildung von <http://www.epibeat.com/category/tools-technology/>)

Methylierte Cytosine sind vor dieser Deaminierung hingegen durch ihre Methylgruppe geschützt. Bei einer darauffolgenden Polymerasen-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) werden Uracile durch Thymin ersetzt, während Cytosine in der Sequenz als solche erhalten bleiben (siehe Abbildung 2-3). Dadurch kann man bei späterer Sequenzierung unterscheiden zwischen methylierten und nichtmethylierten CpG-Dinukleotiden.

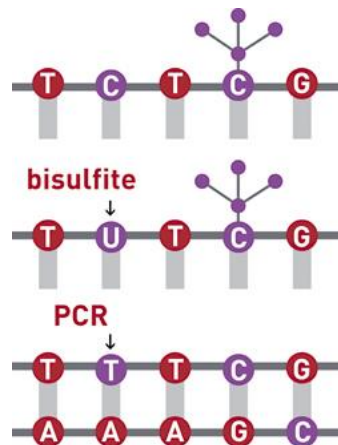


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des Bisulfitkonvertierungsprinzips.

Cytosin wird ersetzt durch Uracil welches wiederum in der darauffolgenden PCR durch Thymin ersetzt wird, wodurch bei anschließender Sequenzierung unterschieden werden kann zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen. (Abbildung von <http://www.diagenode.com/en/applications/bisulfite-conversion.php>)

2.5.2.1 Bisulfitkonvertierung weniger oder einzelner Zellen

Für die Bisulfitkonvertierung der DNA weniger oder einzelner Zellen, wurde das EZ DNA Methylation-Direct Kit verwendet und die Konvertierung entsprechend des Protokolls durchgeführt.

In einem ersten Schritt wird zunächst die DNA durch einen Proteinase K-Verdau freigesetzt, wobei zur Probe jeweils 10 µl 2x Digestionspuffer und 1 µl Proteinase K gegeben und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt wird. Der Verdau selbst wird für 20 min bei 50°C durchgeführt und dient der Freisetzung der DNA aus der Zelle. Anschließend werden 130 µl CT-Konversionsreagenz zugegeben, welches vorher entsprechend des Protokolls des Herstellers vorbereitet wurde. Die Proben werden dann für die Bisulfitkonvertierung in einem Thermocycler platziert und durchlaufen folgendes in Tabelle 2-15 angegebenes Programm.

Tabelle 2-15: Bisulfitkonvertierungsprogramm

Schritt	Temperatur	Dauer
Schritt 1	98°C	8 min
Schritt 2	64°C	3,5 h
Schritt 3	4 °C	Bis zu 20h

Anschließend wird die DNA an Säulen gebunden und aufgereinigt. Dazu findet im ersten Schritt die Bindung der DNA an die Säulenmatrix statt, wozu zunächst 400 µl

Bindungspuffer auf die Säule gegeben werden, gefolgt von den 150 µl der Bisulfitkonvertierungsreaktion. Danach wird das Reaktionsgefäß, in welchem die Bisulfitbehandlung erfolgte, noch einmal mit 200 µl Bindungspuffer gespült um sämtliche DNA zu binden und ebenfalls auf die Säule gegeben. Die Säule wird zum Mischen mehrmals invertiert (10x) und danach wird für 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit (13000 rpm) zentrifugiert. Die DNA ist nun an die Säulenmatrix gebunden. Um Reste der Konvertierungsreaktion vollständig zu entfernen, wird ein Waschschrift durchgeführt für den 100 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und wieder für 30 sec bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert wird. Um die Bisulfitkonvertierung vollständig abzuschließen, ist noch ein Desulfonierungsschritt notwendig. Dazu werden 200 µl Desulfonierungspuffer auf die Säulenmatrix gegeben und die DNA für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird wieder für 30 sec bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert und noch zweimal gewaschen mit jeweils 200 µl Waschpuffer und Zentrifugation für jeweils 30 sec bei voller Geschwindigkeit. Im letzten Schritt wird die DNA eluiert, indem 10 µl Elutionspuffer auf die Säulenmatrix gegeben werden und ein letztes Mal für 30 sec bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert wird. Die bisulfitkonvertierte DNA befindet sich nun im unterhalb der Säule befindlichen 1,5 ml-Reaktionsgefäß.

2.5.2.2 Bisulfitkonvertierung von Spermien-DNA für Deep Bisulfite Sequencing

Da die mittels DBS zu untersuchenden Spermienproben teils nur geringe Spermienkonzentrationen hatten und demzufolge teils nur geringe DNA-Konzentrationen erhalten werden konnten, wurde für die Bisulfitkonvertierung auch hier das EZ DNA Methylation-Direct Kit verwendet. Da die DNA bereits isoliert war, war keine Protease K-Verdau notwendig, sondern es wurde direkt zu den eingesetzten 200 bis 500 ng DNA das CT-Reagenz zugegeben und fortgeföhren wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben.

2.5.3 Limiting Dilution

Um seltene Epimutationen detektieren zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Methode der Limiting Dilution (LD) entwickelt [155]. Da bei Untersuchungen ge-

poolter Proben ein Amplifikationsbias auftreten kann, d. h. dass einzelne DNA-Moleküle präferentiell amplifiziert werden, kann eine selten auftretende Epimutation eventuell nicht detektiert werden, obwohl sie vorhanden ist, weil andere nicht-epimutierte Moleküle in der Überzahl vorliegen. Um dieses Problem des Amplifikationsbias zu umgehen, kann man die LD anwenden. Hierbei wird die bisulfatkonvertierte DNA von wenigen oder einzelnen Zellen entsprechend verdünnt, um anschließend einzeln vorliegende Allele amplifizieren und sequenzieren zu können. Für die LD-Studie an Spermien, für die Proben mit jeweils 11 Spermien vorlagen und somit maximal 11 Allele verfügbar waren, wurde eine 1:20-Verdünnung angewandt. Für die Untersuchung humaner Oocyten, welche noch den Polkörper trugen und somit ein Maximum von 4 Allelen besaßen, wurde eine 1:6-Verdünnung eingesetzt. Nach der entsprechenden Verdünnung der bisulfatkonvertierten DNA, wurden gleiche Volumina in eine entsprechende Anzahl an Wells einer 96-well-PCR-Platte verteilt (Spermien: 20 wells; Oocyten: 6 wells) und dienten als Template für die anschließende Multiplex-PCR. Zusätzlich wurden Negativkontrollen mitgeführt (Spermien: 4; Oocyten: 2), um eventuell während der PCR auftretende Kontaminationen detektieren zu können. Da durch die geringe Ausgangsmenge an DNA und durch die starke DNA-Degradierung während der Bisulfatkonvertierung nicht jede PCR-Reaktion ein Produkt enthalten würde, wurden sämtliche Proben mittels Gelelektrophorese überprüft und nur solche Reaktionen, die ein Produkt enthielten, wurden anschließend pyrosequenziert. Das Prinzip der LD ist noch einmal in Abbildung 2-4 dargestellt.

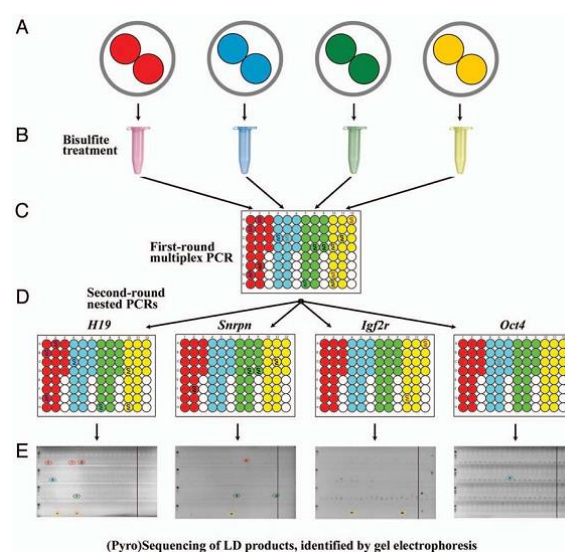


Abbildung 2-4: Prinzip der Limiting Dilution (LD).

A) Zu untersuchende Probe mit wenigen Zellen oder Einzelzelle. B) Bisulfatkonvertierung der zu untersuchenden Proben. C) LD zur Allelvereinzellung. Die Verdünnung wird angepasst an die maximal mögliche Anzahl zu

untersuchender Allele. Anschließend erfolgt die Verteilung gleicher Volumina auf einer 96-well-PCR-Platte und eine Multiplex-PCR zur gleichzeitigen Amplifikation aller zu untersuchenden Gene. D) Nested PCRs erfolgen einzeln für jedes bereits in der Multiplex-PCR amplifizierte Gen. E) Gelelektrophorese zur Überprüfung. Aufgrund der LD und der DNA-Degradierung während der Bisulfitkonvertierung enthält nicht jedes well PCR-Produkte. Erhaltene Produkte werden anschließend pyrosequenziert. Abbildung aus El Hajj et al., 2011 [155].

2.5.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.5.4.1 Multiplex-PCR (MP)

Um möglichst viele Gene von ein und derselben Probe analysieren zu können und da durch den LD-Versuchsansatz selbst, bei dem wenige Zellen oder Einzelzellen untersucht werden sollten, die verfügbare Ausgangsmenge an DNA begrenzt war, wurden für die LD-Experimente im ersten Schritt Multiplex-PCRs (MP) durchgeführt, wodurch gleichzeitig mehrere Gene amplifiziert werden können und zudem genügend Ausgangsmaterial für die darauf folgenden PCRs generiert wird.

Für die Untersuchung von humanen Spermienproben bestand der hierfür entwickelte Assay aus den geprägten Genen *hGTL2*, *hLIT1* und *hPEG3*. Zur Analyse humaner Oocyten wurde ein Assay entwickelt der vier geprägte Gene enthielt (*hGTL2*, *hLIT1*, *hPEG3*, *hSNRPN*) sowie die oocytenspezifischen Variante *hDNMT3Lo* und zwei Pluripotenzgene (*hNANOG*, *hOCT4*). Letztere dienten zusätzlich als Markergene, da sowohl *hDNMT3Lo* als auch die beiden Pluripotenzgene in Oocyten in einem unmethylierten Zustand vorliegen und eine Methylierung in diesen Genen eine Kontamination einer Probe durch somatische Zellen anzeigen kann. Die verschiedenen Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen zur Untersuchung von Spermien bzw. Oocyten sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

Tabelle 2-16: PCR-Reaktionsansatz für eine Multiplex-PCR zur Untersuchung von Spermien.

OF bedeutet outer forward; OR steht für outer reverse.

Reagenz	Volumen [μ l]
10x PCR-Puffer mit $MgCl_2$	2,5
PCR Grade Nucleotide Mix (jedes Nukleotid [10 mM])	0,5
<i>hGTL2</i> OF / OR äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
<i>hLIT1</i> OF3N / OR3N äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
<i>hPEG3</i> OF / OR1 äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
FastStart Taq DNA Polymerase [5U/ μ l]	0,2
Template LD	10
H ₂ O	Ad 25

Tabelle 2-17: PCR-Reaktionsansatz für eine Multiplex-PCR zur Untersuchung von Oocyten.

Reagenz	Volumen [μ l]
10x PCR-Puffer ohne $MgCl_2$	2,5
$MgCl_2$ [25 mM]	4
PCR Grade Nucleotide Mix (jedes Nukleotid [10 mM])	0,5
<i>hGTL2</i> OF / OR äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
<i>hLIT1</i> OF / OR äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
<i>hPEG3</i> OF / OR1 äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
<i>hSNRPN</i> OF / OR äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
<i>hDNMT3Lo</i> OF / OR äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
<i>hNANOG</i> OF2 / OR2 äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
<i>hOCT4</i> OF / OR äußere Primer [33 μ M] forward + reverse	Je 0,33
FastStart Taq DNA Polymerase [5U/ μ l]	0,2
Template LD	10
H ₂ O	Ad 25

Tabelle 2-18: PCR-Bedingungen der Multiplex-PCR zur Untersuchung von Spermien.

	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	35
Primer-Annealing	56 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	45 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
	8 °C	∞	

Tabelle 2-19: PCR-Bedingungen der Multiplex-PCR zur Untersuchung von Oocyten.

	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	35
Primer-Annealing	58 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	45 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
	8 °C	∞	

2.5.4.2 Nested-PCRs

Nachdem mittels MP mehrere Gene gleichzeitig amplifiziert wurden, wurde im nächsten Schritt für jedes einzelne Gen eine weitere Nested PCR durchgeführt. Als Template diente hier die vorherige MP. Bei einer Nested PCR liegen die Primer dieser PCR innerhalb des während der MP generierten Amplikons des zu untersuchenden Gens. Liegt nur einer der beiden verwendeten Primer innerhalb des Amplikons und entspricht der zweite verwendete Primer einem der beiden äußeren Primer der MP,

spricht man von einer Semi-nested PCR. Durch diese weitere PCR wird zum einen genügend Produkt generiert, um anschließend sequenziert werden zu können, zum anderen wird dadurch eine spezifischere Amplifikation des gewünschten Genabschnittes sichergestellt. Des Weiteren trägt einer der beiden verwendeten Primer eine Biotin-Modifikation. Dieses Biotin ist im weiteren Versuchsablauf während der Pyrosequenzierung von Bedeutung. Die verwendeten Reaktionsbedingungen zur Untersuchung von Spermien bzw. Oocyten sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 2-20: PCR-Reaktionsansatz für Nested und Semi-nested PCRs.

Reagenz	Volumen [μ l]
10x PCR-Puffer mit $MgCl_2$	2,5
PCR Grade Nucleotide Mix (jedes Nukleotid [10 mM])	0,5
Innere Primer [10 μ M] forward + reverse	Je 1
FastStart Taq DNA Polymerase [5U/ μ l]	0,2
Template MP	1
H ₂ O	Ad 25

Tabelle 2-21: Primerkombinationen, Annealingtemperaturen und Zyklusanzahl verschiedener Gene.

IF steht für inner forward primer; IR bedeutet inner reverse, Bio gibt an welcher der beiden Primer die Biotin-Modifikation trägt.

Gen	Assay	PCR-Typus	Primerkombination	Annealingtemperatur	Zyklusanzahl
<i>hGTL2</i>	Spermien und Oocyten	Nested	IF / IR-Bio	60 °C	32
<i>hPEG3</i>	Spermien und Oocyten	Nested	IF / IR-Bio	60 °C	32
<i>hLIT1</i>	Spermien	Semi-nested	OF3N = IF / IR-Bio	54 °C	40
<i>hLIT1</i>	Oocyten	Semi-nested	IF / OR-Bio = IR	57 °C	35
<i>hSNRPN</i>	Oocyten	Semi-nested	OF-Bio = IF / IR	60 °C	32
<i>hDNMT3Lo</i>	Oocyten	Semi-nested	IF2 / OR-Bio = IR	60 °C	32
<i>hNANOG</i>	Oocyten	Nested	IF3 / IR4	60 °C	32
<i>hOCT4</i>	Oocyten	Nested	IF / IR-Bio	60 °C	32

Tabelle 2-22: PCR-Bedingungen für Nested / Semi-nested PCRs zur Untersuchung von Spermien und Oocyten.

Annealingtemperatur und Zyklusanzahl variieren genspezifisch und sind in Tabelle 2-21 angegeben.

	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	genspezifisch
Primer-Annealing	genspezifisch	30 sec	
Elongation	72 °C	45 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
	8 °C	∞	

2.5.4.3 Deep Bisulfite Sequencing Library-Generierung

Auch für DBS werden, wie schon für die LD-Experimente, mehrere aufeinander aufbauende PCRs durchgeführt (siehe Abbildung 2-5). Beim DBS dient die erste PCR der Generierung locus-spezifischer Amplikons für die verschiedenen zu untersuchenden Gene. Die hierfür verwendeten Primer enthalten außerdem Universal Tags. Diese Tags dienen als Bindungsplattform für die Primer der zweiten PCR, wodurch nur die Primer der ersten PCR genspezifisch sind, aber die Primer der zweiten PCR amplikonunabhängig universell einsetzbar sind. Mithilfe der zweiten PCR werden probenspezifische Barcodes, so genannte Multiplex Identifiers (MIDs), angefügt. Jede einzelne Probe erhält hier nun ihre eigene MID, damit die Proben nach der Sequenzierung voneinander unterschieden werden können. Des Weiteren werden in der zweiten PCR mithilfe der Primer die 454 Titanium-Sequenzen und die Key-Sequenz an die PCR-Produkte angefügt, welche notwendig sind damit die DNA-Moleküle während der Emulsions-PCR (emPCR) an die dabei verwendeten Beads binden können und damit der GS Junior-Sequenzierer über die Key-Sequenz die zu sequenzierenden PCR-Produkte erkennt.

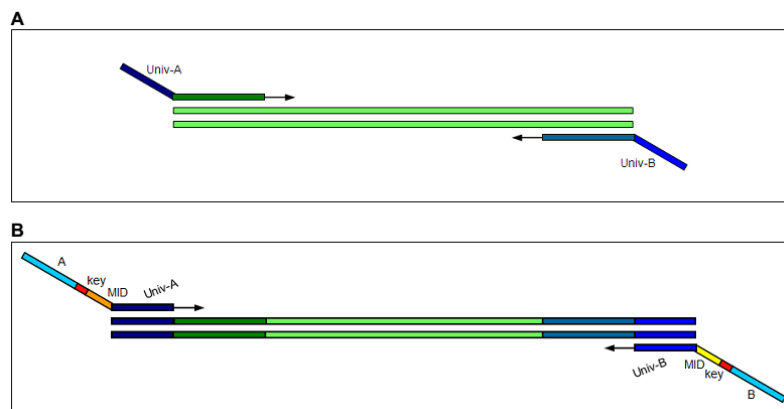


Abbildung 2-5: Prinzip der zwei aufeinander aufbauenden PCRs zur Generierung einer DBS-Library.

A) In der ersten PCR wird ein locus-spezifisches Amplikon generiert, wobei die Primer aus zwei Sequenzbereichen bestehen: ein Teil ist komplementär zum zu amplifizierenden Genabschnitt (dunkelgrün, blau) und der andere Teil besteht aus der Sequenz des Universal Tags A bzw. B (Univ-A bzw. Univ-B, blau). B) Mithilfe der zweiten PCR werden die probenspezifischen MIDs (orange, gelb) sowie die Key-Sequenz (rot) und die 454 Titanium A bzw. B Sequenzen (A bzw. B, türkis) an die Amplikons angefügt. Diese Primer binden über ihre Universal Tags an die bereits in der ersten PCR an die Amplikons angefügten Universal Tag – Sequenzen. (Abbildung aus Roche 454 Sequencing System Guidelines for Amplicon Experimental Design).

Um die Bildung von Primer-Dimeren zu verhindern, welche sich im weiteren Versuchsablauf störend auswirken könnten, wurde zunächst ein Primer separat zusam-

men mit dem Template vorgelegt, während der zweite Primer im Mastermix enthalten war. Indem die beiden Primer nicht gemeinsam im Mastermix vorlagen, sondern erst bei Zugabe des Mastermixes zum Template und somit kurz vor Beginn der PCR zusammengeführt wurden, konnte die Bildung solcher Primer-Dimere verringert werden. Die Bedingungen der ersten DBS-PCR sind in den folgenden Tabellen angegeben.

Tabelle 2-23: DBS erster PCR-Reaktionsansatz für *hPEG3*, *hOCT4* und *hNANOG*.

Reagenz	Volumen [μ l]
10x PCR-Puffer mit $MgCl_2$	2,5
PCR Grade Nucleotide Mix (jedes Nukleotid [10 mM])	0,5
Primer [10 μ M] forward + reverse	Je 0,5
FastStart Taq DNA Polymerase [5U/ μ l]	0,2
Template bisulfitkonvertierte Spermien-DNA	1
H ₂ O	Ad 25

Tabelle 2-24: DBS erster PCR-Reaktionsansatz für *hGTL2*.

Reagenz	Volumen [μ l]
10x PCR-Puffer ohne $MgCl_2$	2,5
$MgCl_2$ [25 mM]	4
PCR Grade Nucleotide Mix (jedes Nukleotid [10 mM])	0,5
Primer [10 μ M] forward + reverse	Je 0,5
FastStart Taq DNA Polymerase [5U/ μ l]	0,2
Template bisulfitkonvertierte Spermien-DNA	1
H ₂ O	Ad 25

Tabelle 2-25: DBS erste PCR – genspezifische Annealingtemperaturen und Zyklusanzahl der PCRs.

Gen	Annealingtemperatur	Zyklusanzahl
<i>hGTL2</i>	60 °C	50
<i>hPEG3</i>	60 °C	40
<i>hNANOG</i>	56 °C	40
<i>hOCT4</i>	62 °C	50

Tabelle 2-26: PCR-Bedingungen der ersten genspezifischen DBS-PCR.

	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	genspezifisch
Primer-Annealing	genspezifisch	30 sec	
Elongation	72 °C	45 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
	8 °C	∞	

Für die zweite DBS-PCR diente das PCR-Produkt der ersten PCR als Template. Die verschiedenen MID-Primer wurden separat pipettiert, zum einen da jeder Probe eine eigene MID zugeordnet wurde, zum anderen um die Bildung von Primer-Dimeren zu verhindern. Dazu wurde zunächst zum Template der forward Primer pipettiert und nach Zugabe des Mastermixes wurde der entsprechende reverse Primer zugegeben. Für diese zweite PCR waren das Primerannealing und die Elongation zu einem einzigen Schritt zusammengefasst.

Tabelle 2-27: DBS zweiter PCR-Reaktionsansatz.

Reagenz	Volumen [μ l]
HotStar Taq Master Mix	25
Primer forward AUT / reverse BUT [10 μ M]	Je 1
Template DBS-erste PCR	3
H ₂ O	Ad 50

Tabelle 2-28: PCR-Bedingungen der zweiten DBS-PCR.

	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	20 sec	45
Primer-Annealing und Elongation	72 °C	45 sec	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
	4 °C	∞	

2.5.5 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung wurden sämtliche PCRs immer einer Gelelektrophorese unterzogen. Insbesondere für LD-Experimente war eine Gelelektrophorese der Nested PCRs unerlässlich, um zu wissen für welche Reaktionsansätze ein Produkt erhalten wurde. Für DBS-Experimente war eine Überprüfung ebenfalls wichtig, um zu wissen welche Ansätze eventuell Primerdimerbanden enthielten und wiederholt werden mussten. Für die Gelelektrophorese wurden aufgrund der kleinen PCR-Produktgrößen immer 2%-Agarosegele verwendet. Pro 100 ml Agarose wurden 2 μ l EtBr bzw. 1,6 μ l RedSafe bzw. 4 μ l HD GreenPlus DNA stain zur Sichtbarmachung der DNA zugesetzt. Je Probe wurden 4 μ l der PCR entnommen und mit 6 μ l 1x La-depuffer gemischt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Gele liefen jeweils bei 170 V, je nach Gelgröße für ca. 12 bis 30 min.

2.5.6 Librarypräparation für Deep Bisulfite Sequencing

2.5.6.1 Library-Aufreinigung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte für DBS erfolgte mittels magnetischer AMPure XP Beads. Das Prinzip dieser Art der Aufreinigung wird in Abbildung 2-6 dargestellt. An dieser Stelle kann sich das Vorkommen von Primer-Dimeren negativ auswirken, da die Magnetbeads bevorzugt kurze DNA-Fragmente binden. Dies bedeutet wiederum dass, wenn viele Primer-Dimere vorliegen, vermehrt diese anstelle des aufzureinigenden PCR-Produktes isoliert werden. Während der Assay-Etablierung ist darauf zu achten solche PCR-Bedingungen zu ermitteln, bei denen möglichst keine oder nur wenige Primer-Dimere gebildet werden.

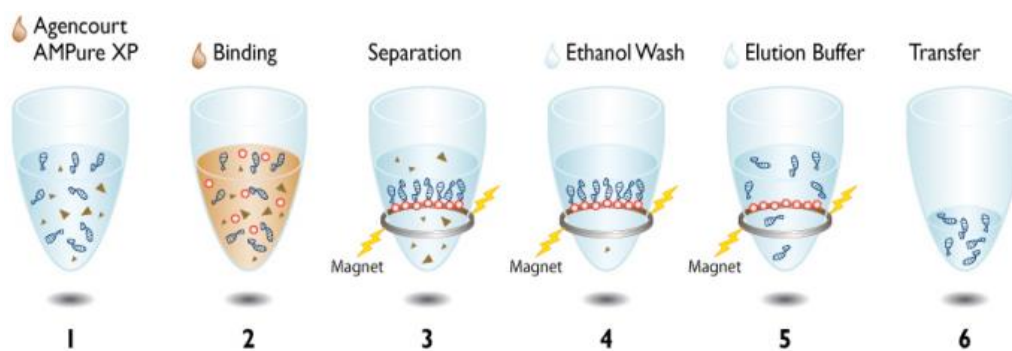


Abbildung 2-6: Prinzip der Libraryaufreinigung mittels Magnetbeads.

1.) AMPure XP Magnetbeads werden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. 2.) PCR-Produkt wird dazu gegeben und inkubiert, damit die DNA an die Beads bindet. 3.) Mithilfe eines Magneten werden an die Magnetbeads gebundene PCR-Produkte von den anderen Bestandteilen des PCR-Reaktionsansatzes getrennt. 4.) Mithilfe von Ethanol werden die PCR-Produkte gewaschen. 5.) Durch Zugabe des Elutionspuffer trennen sich DNA und Magnetbeads und werden magnetisch separiert. 6.) Das aufgereinigte PCR-Produkt wird in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert. (Abbildung von Beckman Coulter

<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/nucleic-acid-sample-preparation/agencourt-ampure-xp-pcr-purification/index.htm#2/10//0/25/1/0/asc/2/A63880//0/1//0/>)

Für die Aufreinigung wurden 35 µl Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, das PCR-Produkt zugegeben und mittels Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach wurden die Magnetbeads mit PCR-Produkt für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die DNA-Moleküle an die Beads binden können, und anschließend für 5 min auf dem Magnetic Particle Collector (MPC) inkubiert, damit sich die Magnetpartikel mit den gebundenen DNA-Molekülen als Pellet an der Seite des Magneten sammeln können, während andere Bestandteile wie Nukleotide und Salze in Lösung bleiben.

Während das Reaktionsgefäß auf dem MPC verblieb, wurde der Überstand nun vorsichtig abgenommen. Zum Waschen wurden 180 µl frischer 75% Ethanol zugegeben und für 1 min inkubiert. Dann wurde das Reaktionsgefäß im MPC um 180° gedreht, damit sich das Pellet löst und eventuell bis dahin noch im Pellet vorhandene Verunreinigungen sich lösen können. Es wurde noch einmal für 1 min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Um noch vorhandene Ethanolreste vollständig zu entfernen wurde das Pellet nun etwa 5 bis 10 min luftgetrocknet. Um die DNA nun zu eluieren, wurden 20 µl Elutionspuffer zugegeben, das Reaktionsgefäß vom MPC genommen und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren vollständig gelöst und noch einmal für 3 min inkubiert. Um DNA und Magnetbeads nun voneinander zu separieren, wurde das Reaktionsgefäß für weitere 2 min in den MPC gestellt und anschließend wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.5.6.2 Library-Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Die Quantifizierung der DBS-Libraries erfolgte mittels des NanoDrop 2000.

Zur Qualitätskontrolle der DBS-Libraries wurden einzelne Proben mittels des BioAnalyzers Agilent DNA 7500 kontrolliert. Hiermit konnten nicht nur DNA-Konzentration und Produktgrößen überprüft werden, sondern mithilfe des BioAnalyzers können auch eventuell noch vorhandene Primer-Dimere detektiert werden. DNA-Farbstoff-Konzentrat und DNA-Gel-Matrix wurden zunächst entsprechend des Agilent DNA 7500-Kit-Protokolls vorbereitet. Zum Beladen des Chips wurde dieser zunächst in die Chip-Priming-Station eingesetzt. Dann wurden zweimal je 9 µl Gel-Farbstoff-Mix entsprechend des Kit-Protokolls gegeben. Danach wurden in jedes der 12 wells und in das DNA-Leiter-well je 5 µl Marker zugesetzt, bevor 1 µl DNA-Leiter und in die anderen 12 wells je 1 µl Probe pipettiert wurden. Der Chip wurde nun aus der Priming-Station entnommen und für 1 min bei 2400 rpm gevortext. Anschließend wurde der Chip in den BioAnalyzer eingesetzt und das Analyseprogramm gestartet.

2.5.6.3 Konzentrationseinstellung und Pooling der DBS-Libraries

Nachdem die genspezifischen Libraries hergestellt waren, musste als Vorbereitung für die klonale Amplifizierung mittels emPCR zunächst in einigen Schritten die Konzentration eingestellt und die Libraries dann zusammengeführt werden, da immer zwei Gene gleichzeitig sequenziert wurden. Im ersten Schritt wurden sämtliche Proben eines Gens in equimolarer Menge von jeweils 400 ng pro Amplicon zusammengeführt. Dieser erste Pool wurde für jedes Gen noch einmal mithilfe der AMPure XP Magnetbeads aufgereinigt. Die einzusetzende Menge an Beads je genspezifischem Pool berechnete sich aus dem Gesamtvolumen des Pools geteilt durch 1,14. Zum Waschen wurden hier jeweils 500 µl 75% Ethanol verwendet, damit das Pellet vollständig bedeckt war. Für die Elution wurden 50 µl des Elutionspuffers verwendet. Alles andere entsprach der bereits beschriebenen Prozedur.

Im nächsten Schritt wurden für die genspezifischen ersten Pools zunächst die Molekülanzahl pro µl ermittelt und die Pools dann auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^9$ Moleküle / µl verdünnt. Dazu wird zunächst die DNA-Konzentration des aufgereinigten Pools zweimal am NanoDrop ermittelt und daraus ein Mittelwert gebildet. Die Anzahl der vorhandenen Moleküle je µl Library berechnet sich nun wie folgt:

$$\frac{\text{Molekülanzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{Probenkonzentration} \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] * 6,022 * 10^{23}}{656,6 * 10^9 * \text{Amplikonlänge [bp]}}$$

Die Amplikonlängen betragen 335 bp für *hPEG3*, 383 bp für *hNANOG*, 414 bp für *hOCT4* und 417 bp für *hGTL2*. Anhand der errechneten Molekülanzahl je µl kann man nun berechnen wieviel µl 1x TE-Puffer benötigt werden um 1 µl der Library auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^9$ Moleküle / µl zu verdünnen.

$$\text{Volumen 1x TE – Puffer } [\mu\text{l}] = \frac{\text{Molekülanzahl pro } \mu\text{l}}{1 * 10^9} - 1$$

Nachdem nun $1 \cdot 10^9$ – Verdünnungen der Libraries jedes zu sequenzierenden Gens hergestellt wurden, wurde ein zweites Mal gepoolt, wobei jeweils 10 µl von jeder $1 \cdot 10^9$ – Library-Verdünnung vereint wurden. Dieser zweite Pool wurde weiter verdünnt

auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Moleküle / μl (2 μl Pool 2 + 198 μl H_2O) und diese wurde auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Moleküle / μl verdünnt (10 μl $1 \cdot 10^7$ – Verdünnung + 90 μl H_2O). Diese finale $1 \cdot 10^6$ – Verdünnung wurde dann später für die emPCR eingesetzt.

2.5.7 Pyrosequenzierung

2.5.7.1 Prinzip der Pyrosequenzierung

Bei der Pyrosequenzierung handelt es sich um eine “Sequencing-by-Synthesis”-Methode. Dies bedeutet, dass während ein neuer DNA-Strang durch eine DNA-Polymerase synthetisiert wird, in Realzeit der sequentielle Einbau einzeln nacheinander zugegebener Nukleotide detektiert und somit sequenziert wird. Ist ein Nukleotid komplementär zum Template, wird während der Inkorporation dieses Nukleotids ein Pyrophosphat (PP_i) freigesetzt, welches wiederum ein bioluminometrisches Signal generiert. Der zur Sequenzierung eingesetzte Enzymmix besteht aus 4 verschiedenen Komponenten: 1.) dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase für den Einbau des zum Template komplementären Nukleotids, 2.) der ATP-Sulfurylase, welche PP_i zu ATP umsetzt, 3.) der Luciferase, welche mittels ATP D-Luciferin zu Oxyluciferin oxidiert, was bei seinem Zerfall wiederum ein Photon freisetzt, welches von der CCD (charge-coupled-device) – Kamera als Lichtblitz detektiert wird, und 4.) der Apyrase, welche nicht inkorporiertes Nukleotid degradiert, bevor das nächste Nukleotid zugegeben wird und der Zyklus erneut beginnt [156]. Das Prinzip der Pyrosequenzierung ist noch einmal in Abbildung 2-7 dargestellt. Wird ein Nukleotid ein einziges Mal eingebaut, wird nur ein Photon frei und detektiert. Folgt in der Sequenz des Templates ein Nukleotid mehrmals hintereinander, wird das komplementäre Nukleotid dementsprechend mehrmals inkorporiert, wodurch mehr PP_i und dementsprechend mehr Photone freigesetzt werden, was wiederum zu einem stärkeren Lichtsignal führt. Im Pyrogramm, welches der Darstellung der erhaltenen Sequenz dient, wird der Peak für ein bestimmtes Nukleotid in diesem Fall größer dargestellt (z. B. doppelt bei doppeltem Einbau des Nukleotids), als bei einfacher Inkorporation.

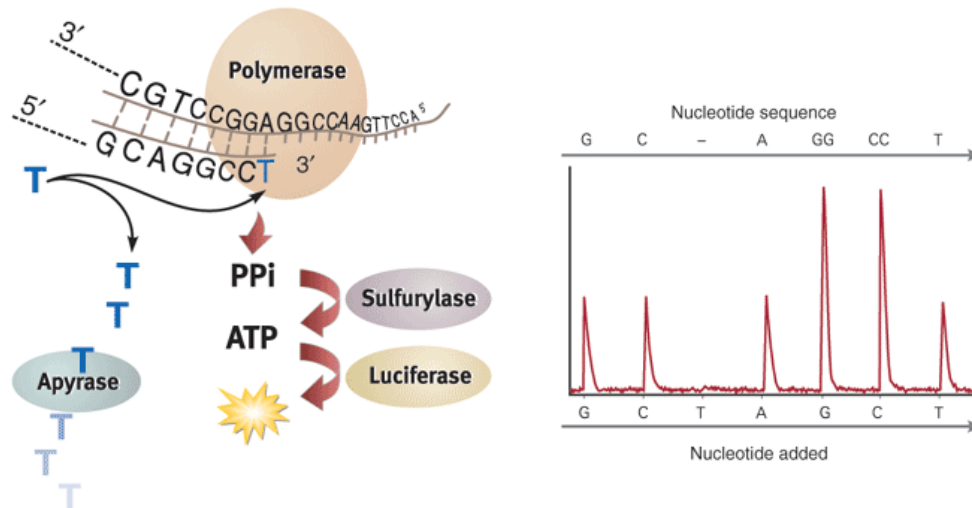


Abbildung 2-7: Prinzip der Pyrosequenzierung.

Beim Einbau eines zum Template komplementären Nucleotids wird PP_i freigesetzt, welches wiederum zu ATP umgesetzt wird. ATP wird von der Luciferase verwendet, ein Photon wird freigesetzt und von der CCD-Kamera detektiert. Nicht eingebautes Nucleotid wird von der Apyrase abgebaut. Wird ein Nucleotid zweimal direkt hintereinander inkorporiert, wird ein doppelt so hohes Signal wie bei einfachem Einbau erhalten und der Peak im Pyrogramm ist dementsprechend doppelt so hoch. (Abbildung aus England and Pettersson, 2005 [157])

2.5.7.2 Pyrosequenzierungsablauf

Für die Pyrosequenzierung wurden zunächst vom PCR-Produkt 10 μ l (bei schwachen PCR-Produkten 20 μ l) in einer PCR-Platte vorgelegt. Anschließend wurde der Mastermix aus Annealingpuffer und Pyrosequenzierprimer für die entsprechende benötigte Reaktionsanzahl vorbereitet und auf der Sequenzierplatte vorgelegt (siehe Tabelle 2-29). Daraufhin wurde der Mastermix für das Template vorbereitet und verteilt (siehe Tabelle 2-30). Dieser Mastermix enthält Sepharose, welche an das an einem der beiden Primer des PCR-Produktes gebundene Biotin bindet, was wiederum in den folgenden Waschschrritten die Aufreinigung und Isolation des Templates ermöglicht. Nachdem der Mastermix zum Template gegeben wurde, wurde zunächst unter Schütteln (Vortexer, 1400 rpm) für 5 min inkubiert, um die Bindung von Sepharose und Biotin zu ermöglichen. Daraufhin wurde das Template-Sepharose-Gemisch an der Waschstation unter Vakuum an den Waschkopf angesogen. Durch die Biotin-Sepharose-Bindung kann das Template nicht in den Waschkopf gesogen werden, da es zu groß für die Poren des Waschkopfes ist, während die verbleibende Flüssigkeit abgesogen wird. Danach wurde das am Waschkopf befindliche Template zunächst kurz (~ 20-30 sec) in 70% Ethanol gewaschen. Daraufhin wurde der Waschkopf kurz

in den Denaturierungspuffer überführt. Hier wird der unbiotinylierte Strang des PCR-Produkts vom biotinylierten Strang getrennt, welcher weiterhin an die Sepharose gebunden ist und somit am Waschkopf gehalten wird. Anschließend wurde das einzelsträngige biotinylierte PCR-Produkt gewaschen, um eventuell noch verbliebene unbiotinylierte Stränge sicher zu entfernen, wozu der Waschkopf wieder für ca. 20-30 sec in Waschpuffer gehalten wurde. Im letzten Schritt wurde der Waschkopf über der Sequenzierplatte, welche bereits Annealingpuffer und Sequenzierprimer enthielt, platziert und durch Abschalten des Vakuums wurde das Template vom Waschkopf auf die Platte überführt. Danach wurde die Sequenzierplatte für 2 min auf den 80°C heißen Heizblock gestellt und anschließend für weitere 2 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Nachdem die Küvetten des Pyrosequenzierers mit der von der Software berechneten (Assay- und Probenanzahl-abhängigen) Menge an Enzym, Substrat und Nukleotiden beladen wurden, wurde die Sequenzierplatte im Gerät positioniert und der Sequenzierlauf gestartet.

Tabelle 2-29: Mastermix aus Annealingpuffer und Sequenzierprimer.

Mastermix für Sequenzierplatte	1x [μ l]
PyroMark® Annealing Buffer	11,5
Pyrosequenzierprimer	0,5

Tabelle 2-30: Mastermix aus Sepharose und Bindungspuffer zur Templatebindung.

Mastermix für Template	1x [μ l]
Streptavidin Sepharose™ High Performance	2
PyroMark® Binding Buffer	40
Wasser	ad 70

2.5.8 Deep Bisulfite Sequencing

2.5.8.1 Klonale Amplifizierung mittels Emulsions-PCR

Vor der DBS-Sequenzierung wurde die Emulsions (em)-PCR durchgeführt. Sie dient der klonalen Amplifizierung der zu sequenzierenden Allele. Hierbei bindet ein einziges DNA-Molekül an ein Bead welches von einer Öl-Suspension umgeben ist (siehe Abbildung 2-8). Die Bindung des DNA-Moleküls findet über die während der zweiten DBS-PCR an das Amplicon angefügten 454 Titanium A bzw. B Adapter statt, welche sich ebenfalls auf den Capture Beads A bzw. B befinden. Innerhalb dieses Öl-

Tropfens findet die PCR dann statt. Dadurch erhält man nun mehrere klonale Kopien ein und desselben Allels, die dann anschließend sequenziert werden können.

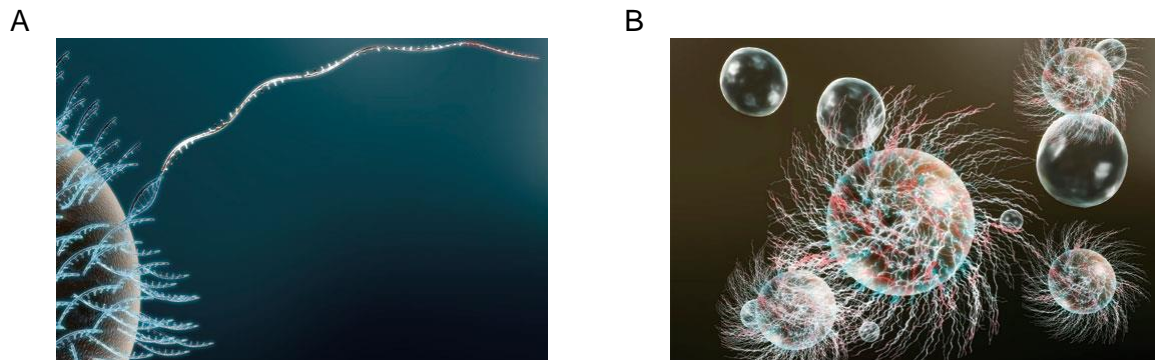


Abbildung 2-8: DBS-emPCR-Prinzip.

A: Ein einzelnes DNA-Molekül der Library bindet über die 454 Titanium Adapter an ein Capture Bead, welches von einem Öl-Tropfen umgeben ist, in welchem die PCR stattfindet. B: Nach der emPCR befinden sich an demselben Bead tausende klonale Kopien des ursprünglichen Amplikons, welche nun sequenziert werden können. (Abbildungen Roche <http://454.com/products/technology.asp>).

Für die emPCR wurde das Roche GS Junior Titanium emPCR Kit Lib-A und das dazu gehörige Protokoll (Roche emPCR Amplification Method Manual Lib-A) verwendet. Zunächst wurde die Prä-Emulsion vorbereitet, entsprechend des Protokolls, indem Emulsionsöl und 1x Mock-Mix zusammen in das Turrax stirring-Reaktionsgefäß gegeben wurden und diese Suspension für 5 min auf dem Ultra Turrax Tube Drive (UTTD) bei 4000 rpm gemischt wurde. Währenddessen wurden die Live Amp Mixe A bzw. B zu bereitet und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das Pipettierschema ist in Tabelle 2-31 angegeben.

Tabelle 2-31: DBS-emPCR Reaktionsansätze für Live Amp Mix A bzw. B.

Reagenz	Volumen [μ l]
H ₂ O	205
Additive	260
Amp Mix	135
Amp Primer A bzw. B	40
Enzymmix	35
PPiase	1

Im nächsten Schritt wurden die Capture Beads A bzw. B gewaschen, indem jeweils 1 ml 1x Waschpuffer zugegeben und für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen und der Waschschrift ein

weiteres Mal wiederholt. Nun konnte die auf $1 \cdot 10^6$ Moleküle / μl verdünnte DNA Library zu den Capture Beads gegeben werden. Das einzusetzende Volumen berechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{Volumen DNA Library } [\mu\text{l}]}{\text{Capture Bead Tube}} = \frac{\text{gewünschte Anzahl Moleküle je Bead} \cdot 5 \text{ Mio. Beads}}{\text{Librarykonzentration } \left[\frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}} \right]}$$

Hier wurden 1,5 Kopien pro Bead eingesetzt, was ein einzusetzendes Volumen von $7,5 \mu\text{l}$ der $1 \cdot 10^6$ Moleküle / μl DNA Library ergibt. Da hier jedoch nicht mit genomischer DNA, sondern mit bisulfitkonvertierter und demzufolge stark degradiertes DNA gearbeitet wurde, wurde das errechnete Volumen verdoppelt und dementsprechend zu beiden Capture Beads jeweils $15 \mu\text{l}$ DNA Library gegeben. Anschließend wurde zum Mischen kurz gevortext. Danach erfolgte die Emulsifikation, indem $600 \mu\text{l}$ Live Amp Mix B zur Capture Beads B – Library – Suspension gegeben und gevortext wurde und diese Lösung dann in das Turrax Tube zur Prä-Emulsion pipettiert und auf dem UTDD bei 2000 rpm für 5 min gemischt wurde. Dasselbe wurde mit Live Amp Mix A und Capture Beads A – Library wiederholt. Anschließend wurden je $85 \mu\text{l}$ der Emulsion auf einer 96 well – PCR-Platte verteilt für die folgende Amplifikationsreaktion. Die emPCR-Bedingungen sind in Tabelle 2-32 angegeben.

Tabelle 2-32: DBS-emPCR-Bedingungen.

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	4 min	1
94 °C	30 sec	50
58 °C	4:30 min	
68 °C	30 sec	
10 °C	Bis zu 16 h	

2.5.8.2 Sequenzierung

Nach der emPCR waren mehrere Schritte notwendig um die Beads aus der Emulsion zu lösen und aufzureinigen. Auch hierfür wurde das Roche GS Junior Titanium emPCR Kit Lib-A und das dazu gehörige Protokoll (Roche emPCR Amplification Method Manual Lib-A) verwendet.

Zunächst wurde mittels Vakuum die Emulsion in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und die 96 well – PCR-Platte 3x mit Isopropanol gewaschen und ebenfalls

aspiriert. Anschließend wurde die im 50 ml Reaktionsgefäß befindliche Emulsion mit Isopropanol auf ein Gesamtvolumen von 35 ml aufgefüllt und stark gevortext, um die Emulsion zu lösen. Danach wurde für 5 min bei 930 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es wurden dann 10 ml Enhancingpuffer zugegeben, gevortext und mit Isopropanol auf 40 ml aufgefüllt, wieder gevortext und erneut zentrifugiert (5 min, 930 x g). Der Überstand wurde wieder abgenommen, 1 ml Enhancingpuffer und Isopropanol ad 35 ml zugegeben, gevortext und zentrifugiert (5 min, 930 x g) und dann wieder der Überstand abgenommen. Dasselbe wurde wiederholt mit 1 ml Enhancingpuffer und 100% Ethanol ad 35 ml und noch einmal nur mit Enhancingpuffer. Der Überstand wurde dann bis auf 5 ml abgenommen und das Pellet in diesem Volumen resuspendiert. Dann wurde 1 ml in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß überführt, welches kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert wurde um dann den Überstand abnehmen zu können. Dies wurde wiederholt und das 50 ml Reaktionsgefäß dann noch einmal mit 1 ml Enhancingpuffer gespült, um keine Beads zu verlieren. Anschließend wurde das Beadpellet noch 3x mit Enhancingpuffer gewaschen, indem jeweils 1 ml Enhancingpuffer zugegeben, kurz gevortext, kurz in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde.

Nun erfolgte die Anreicherung der DNA-tragenden Beads. Dazu wurde zunächst 1 ml MELT-Lösung (85 µl 10 M NaOH, 5 ml H₂O) zur Denaturierung zur DNA-Bead-Suspension gegeben, das Reaktionsgefäß für ca. 5 sec auf einen 65°C warmen Heizblock gegeben und dann 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und erneut 1 ml MELT zugegeben und das Ganze wiederholt. Danach wurde 3x mit Annealingpuffer gewaschen, indem wieder 1 ml Puffer zugegeben, kurz gevortext, kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Danach wurden 45 µl Annealingpuffer zur DNA-Bead-Suspension gegeben sowie je 15 µl Enrichment Primer A und B. Es wurde wieder gevortext, anschließend für 5 min bei 65°C inkubiert und dann für 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde 3x mit Enhancingpuffer gewaschen, um nicht gebundene Enrichmentprimer zu entfernen, indem wieder 1 ml Puffer zugegeben, gevortext, zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Dann wurde noch einmal 1 ml Enhancingpuffer zugegeben und gevortext und die so vorbereitete DNA-Bead-Suspension bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert. Als nächstes wurden die Enrichment-Beads vorbereitet. Dazu wurden die Beads zunächst 2x gewaschen, indem 500 µl Enhancingpuffer zugegeben, kurz gevortext, die Beads im MPC pelletiert und dann

der Überstand abgenommen wurde. Die gewaschenen Enrichment-Beads wurden dann in 80 µl Enhancingpuffer resuspendiert und zur DNA-Bead-Suspension gegeben. Anschließend wurde für 5 min auf einem Rotator inkubiert. Um nun ungebundene Beads ohne Amplikons von solchen Beads mit DNA zu trennen und dadurch die DNA-tragenden Beads anzureichern, wurde das Reaktionsgefäß auf den MPC gesetzt. Die magnetischen Enrichment-Beads, welche DNA-tragende Beads gebunden hatten, bildeten an der Seite des Magneten ein Pellet, während Beads ohne Amplicon nicht an Enrichment-Beads binden konnten und dementsprechend ausflogen. Um sämtliche ungebundenen Beads zu entfernen, wurde mehrmals gewaschen, indem je 1 ml Enhancingpuffer zugegeben, kurz auf dem MPC inkubiert und dann der Überstand mit ungebundenen Beads entfernt wurde. Um nun die angereicherten DNA-tragenden Beads wieder von den Enrichment-Bead zu lösen, wurde das Reaktionsgefäß aus dem MPC entnommen, 700 µl MELT zugesetzt, kurz (~10 sec) im Heizblock (65°C) erwärmt, kurz gevortext und das Reaktionsgefäß dann wieder in den MPC gesetzt. Dies wurde mehrmals wiederholt. Durch Zugabe der MELT kommt es zur Denaturierung und die DNA-tragenden Beads lösen sich von den Enrichment-Beads. Da die Enrichment-Beads magnetisch sind, während die DNA-tragenden Beads es nicht sind, können die beiden Bead-Sorten so voneinander separiert werden. Anschließend wurden die DNA-Beads 3x mit Annealingpuffer gewaschen, indem wieder 1 ml Puffer zugegeben, kurz schwach gevortext, kurz zentrifugiert und der Überstand wieder abgenommen wurde. Danach wurden 100 µl Annealingpuffer sowie je 15 µl Sequenzierprimer A und B zugesetzt, kurz schwach gevortext und für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde, um ungebundene Primer zu entfernen, 3x mit Annealingpuffer gewaschen, indem wieder 1 ml zugegeben, kurz schwach gevortext, kurz zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen wurde. Abschließend wurde erneut 1 ml Annealingpuffer zugesetzt und gevortext und die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die darauf folgenden Schritte wurden das GS Junior Titanium Sequencing Kit und das GS Junior Titanium Pico Titer Plate Kit sowie das dazugehörige Roche-Protokoll (Sequencing Method Manual) verwendet. Am Sequenzierer wurden vor jedem Sequenzierlauf zwei Pre-Wash-Schritte entsprechend Protokoll durchgeführt, ebenso wie die Vorbereitung der Sequenzierreagenzien und das Priming der Reagenzien am Gerät entsprechend Protokoll verlief.

Des Weiteren mussten die angereicherten DNA-Beads noch weiter vorbereitet werden für die Sequenzierung. Hierzu wurden zunächst 6 µl Kontroll-Beads zu den angereicherten DNA-Beads gegeben sowie 500 µl Bead Buffer 2 (BB2; 50 ml CB-Puffer + 6,5 µl Apyrase). Dann wurde kurz schwach gevortext und die Suspension für mindestens 20 min auf dem Rotator inkubiert. Als nächstes wurden Packing Beads, Enzym Beads und PPIase Beads vorbereitet. Die Packing Beads wurden 4x mit BB2-Puffer gewaschen, indem 1 ml BB2-Puffer zu den Beads gegeben wurden, diese dann gevortext und 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen wurde. Nach dem Waschen wurden 220 µl BB2-Puffer zugesetzt, gevortext und die Beads bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Enzym und PPIase Beads wurden jeweils 3x gewaschen. Auch hier wurde wieder jeweils 1 ml BB2-Puffer zugegeben, die Beads wurden dann durch Schnipsen gemischt, in der Tischzentrifuge kurz zentrifugiert und im MPC pelletiert. Die Überstände wurden wieder verworfen. Nach dem Waschen wurde zu den PPIase Beads 410 µl BB2-Puffer gegeben, gemischt und die Beads wurden wie die Packing Beads auf Eis gelagert. Zu den Enzym Beads wurde nach dem Waschen 400 µl BB2-Puffer zugesetzt und gemischt. Dann wurden die Enzym Pre-Layer und Post-Layer hergestellt nach dem in Tabelle 2-33 angegebenen Pipettierschema. Diese Reaktionsansätze wurden ebenfalls wieder auf Eis gelagert.

Tabelle 2-33: Pipettierschema für Enzym Pre- und Post-Layer.

Reaktionsansatz	BB2-Puffer Volumen [µl]	Enzym Beads Volumen [µl]	Gesamtvolumen [µl]
Enzym Pre-Layer	300	115	415
Enzym Post-Layer	180	230	410

Als nächstes wurde der Bead Deposition Device (BDD) und die Pico Titer Plate (PTP) zusammengesetzt, entsprechend der Anweisung des Protokolls. Auf die PTP wurden nun zunächst 350 µl BB2-Puffer geladen, für 5 min bei 1620 rcf zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgezogen. Während der BDD zentrifugierte, wurde der Reaktionsmix aus DNA-tragenden Beads und Packing Beads weiter vorbereitet. Dazu wurden die DNA-tragenden Beads nun vom Rotator genommen, kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand bis auf 50 µl abgenommen. Dann wurden 44 µl Polymerase, 20 µl Polymerase Cofaktor und weitere 75 µl BB2-Puffer zugegeben und nochmals für 10 min auf dem Rotator inkubiert, be-

vor 195 µl der Packing Beads zugegeben wurden. Anschließend wurde nochmals für 5 min auf dem Rotator inkubiert. Während die Beads inkubierten, wurde die im BDD befindliche PTP weiter beladen. Hierzu wurden nun langsam 370 µl des Enzym-Pre-Layer-Mixes auf die PTP gegeben und der BDD wieder für 5 min bei 1620 rcf zentrifugiert. Nachdem die Inkubation der DNA und Packing Beads beendet war, wurde nun der Überstand von der PTP abgezogen und es wurden 350 µl des DNA-Packing-Beads-Mixes auf die PTP pipettiert. Anschließend wurde für 10 min bei 1620 rcf zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und anschließend 350 µl des Enzym-Post-Layer-Mixes zugegeben und nochmals zentrifugiert (10 min, 1620 rcf). Nach Abziehen des Überstandes wurden nun 380 µl der PPIase Beads auf die PTP gegeben und noch einmal für 5 min bei 1620 rcf zentrifugiert. Dann wurde der Überstand der PPIase Beads von der PTP abgenommen, der BDD vorsichtig geöffnet und die PTP in den Sequenzierer eingesetzt. Der Sequenzierlauf konnte danach gestartet werden. Die Sequenzierung selbst erfolgt am GS Junior nach dem Prinzip der Pyrosequenzierung (siehe Abbildung 2-9). Da auf der PTP in jedem well nur ein einzelnes Bead mit den während der emPCR generierten klonalen Kopien eines Allels der Library vorliegt (siehe Abbildung 2-9), können die erhaltenen Lichtsignale genau zugeordnet werden und ergeben dann zum Schluss die finale Sequenz. Im Gegensatz zur Standard-Pyrosequenzierung, wie sie für die LD-Experimente verwendet wurde, wird am GS Junior jedoch kein genspezifischer Assay angewandt, sondern es wird nach und nach jedes Nukleotid zu gegeben und dessen Einbau detektiert.

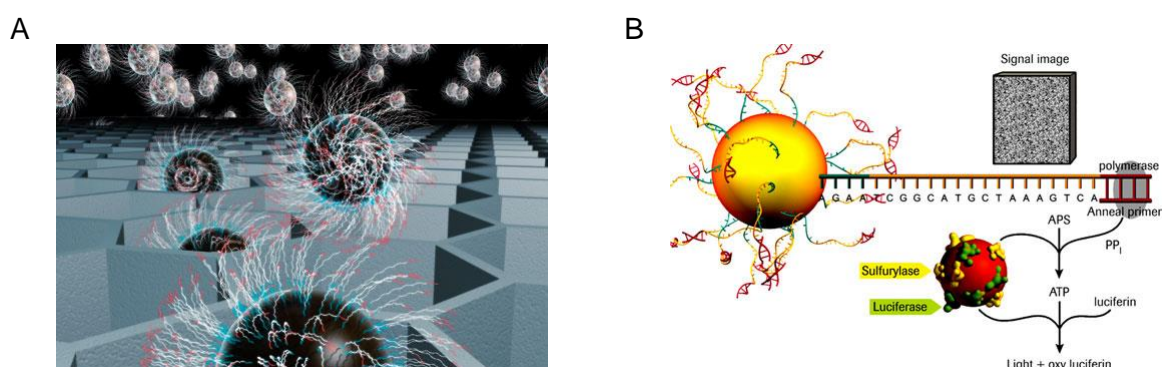


Abbildung 2-9: Prinzip der Sequenzierung am GS Junior.

A: Die PTP besteht aus wells, die jeweils nur ein einziges Bead aufnehmen, wodurch die während der Sequenzierung erhaltenen Signale eindeutig einer bestimmten Position zugeordnet werden können. B: Die Sequenzierung selbst erfolgt nach dem Prinzip der Pyrosequenzierung. (Abbildungen Roche <http://454.com/products/technology.asp>).

2.5.9 Datenanalyse

2.5.9.1 Analyse von Pyrosequenzierdaten

Für die Auswertung von Pyrosequenzierungsergebnissen wurden nur solche Ergebnisse verwendet, die von guter Qualität waren. Zeigte eine Probe zu geringe Qualität wurde die Sequenzierung wiederholt.

Als vollständig methyliert wurden alle Allele gewertet, die eine Methylierung von 80 – 100% zeigten. Unmethylierte Allele zeigten Werte von 0 – 20%. Intermediäre Methylierungswerte (21 – 79%) zeigten eine somatische Kontamination an, da mittels der LD-Technik nur einzelne Allele analysiert werden, die nur in den Zuständen methyliert oder unmethyliert auftreten können. War nur ein einziges CpG eines Allels betroffen, wurde dieses CpG von der Auswertung ausgeschlossen und anhand der verbliebenen CpGs ein neuer Methylierungsmittelwert für das Allel berechnet. Zeigten hingegen mehr als ein CpG intermediäre Werte, wurde das ganze Allel von der Auswertung ausgeschlossen. Allele wurden als abnorm methyliert definiert, wenn $\geq 50\%$ der untersuchten CpGs des Allels eine dem normalen Methylierungsmuster entgegengesetzte Methylierung aufwiesen. Das Gen *hGTL2* wird in Oocyten exprimiert, während es in Spermien methyliert vorliegt. Die anderen hier untersuchten geprägten Gene *hLIT1*, *hPEG3* und *hSNRPN* werden alle in Spermien exprimiert und sind in Oocyten methyliert. Die Pluripotenzgene *hNANOG* und *hOCT4* sowie das Gen *hDNMT3Lo* liegen in Oocyten unmethyliert vor. Außerdem können sporadisch CpG-Fehler auftreten, biologisch oder durch eine nicht vollständige Bisulfitkonvertierung bedingt. Solche Allele zeigen jedoch für mehr als 50% der untersuchten CpGs normale Methylierungsmuster, weshalb sie insgesamt als normal methyliert zu werten sind.

Da Oocyten für ihre Reifung notwendigerweise von somatischen Cumuluszellen umgeben sind, wurden für die Auswertung der Daten der humanen Oocyten besonders strenge Ausschlusskriterien angewandt. Für die Spermienproben war dies nicht notwendig, da die Spermien einzeln selektiert wurden. Eventuell auftretende Kontamination konnte hier anhand intermediärer Methylierungsmuster detektiert werden. Da die Oocyten jedoch zunächst von den Cumulus-Zellen befreit werden mussten und an der die Oocyte umgebenden Zona pellucida eventuell noch DNA-Moleküle, freige-

setzt während der Entfernung der Cumulusschicht, hätten sitzen können, war hier eine strenge Filterung der Ergebnisse notwendig, um nicht versehentlich somatische Methylierungsmuster als Epimutationen der Oocyte zu werten. Deshalb wurden in den Oocyten-LD-Assay die Gene *hDNMT3Lo*, *hOCT4* und *hNANOG* integriert, welche in Oocyten unmethyliert vorliegen, in somatischen Zellen jedoch methyliert sind.

Im ersten Schritt wurden die Methylierungsmuster der Markergene betrachtet. Intermediäre oder Hypermethylierung deutete auf Kontamination hin. Trat dieses nun in mehr als einem Markergen auf, wurden die für diese Oocyte erhaltenen Ergebnisse vollständig ausgeschlossen, da man somatische Kontamination annehmen musste. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob eine Oocyte zusätzlich zu intermediärer oder Hypermethylierung in einem Markergen auch noch intermediäre oder abnorme Methylierung in einem der geprägten Gene zeigte. War das der Fall, wurde wieder somatische Kontamination angenommen und die Ergebnisse dieser Oocyte ausgeschlossen. Wenn ein intermediäres Allel nur für ein einziges Gen auftrat, wurde nur dieses Allel von der Analyse ausgeschlossen. Hier konnte man davon ausgehen, dass es sich weniger um eine somatische Kontamination durch Cumuluszellen als um irgendeine während der PCR-Durchführung aufgetretene Kontamination handelt. Im letzten Schritt wurde nun überprüft ob die Anzahl der analysierten Allele stimmig ist. Da die untersuchten Oocyten noch von ihrer Zona pellucida umgeben waren und dementsprechend noch das Polkörperchen trugen, konnte von einer maximalen Anzahl von 4 amplifizierbaren Allelen ausgegangen werden. Für den Fall, dass für ein oder mehrere Gene einer Oocyte Ergebnisse für mehr als diese maximal 4 möglichen Allele erhalten wurden, wurde selbst wenn die Methylierungsmuster aussahen wie „Oocyten-Muster“ dennoch von einer Kontamination ausgegangen und die Ergebnisse dieser Oocyte wieder vollständig von der Auswertung ausgeschlossen.

Nach dem Filtern zum Ausschluss kontaminierter Ergebnisse wurden dann jeweils die Anzahl normal und abnorm methylierter Allele sowie die Anzahl an Allelen mit CpG-Fehlern ermittelt. Zur statistischen Auswertung wurde der Fisher's-Exact-Test angewandt zur Ermittlung von p-Werten. Zur Visualisierung der Sequenzierergebnisse wurden Lollipop-Diagramme mithilfe des BiQAnalyzers erstellt [158].

2.5.9.2 Analyse von DBS-Daten

Die erhaltenen Sequenzierdaten wurden direkt am GS Junior gefiltert und Daten, die nicht den Qualitätsansprüchen entsprachen, entfernt. Da hier mit bisulfatkonvertierter DNA gearbeitet wurde, wurde der Roche bisRecommendationFilter angewandt, wodurch Reads, die normal nicht den Qualitätsansprüchen des GS Junior Filters entsprechen, zugelassen werden. Mithilfe des Amplifyzer-Programms wurden die verschiedenen Reads separiert [159]. Dazu werden dem Programm die Sequenzen der untersuchten Gene und die Sequenzfolgen der einzelnen MIDs vorgegeben. Das Programm aligniert und gibt Text-Dateien aus, in welchen die Anzahl sequenzierter Reads und die Ergebnisse der einzelnen untersuchten CpG-Stellen jedes einzelnen Reads gegeben sind. Reads, also Allele, wurden als abnorm methyliert definiert, wenn $\geq 50\%$ der analysierten CpGs eine dem normalen Muster entgegengesetzte Methylierung zeigten. Dies bedeutet *hPEG3*, das in Spermien unmethyliert vorliegt, dass eine Hypermethylierung für ≥ 10 CpGs der 19 insgesamt analysierten CpGs als abnorm galt, während für die anderen methylierten Gene eine Demethylierung (Hypomethylierung) für ≥ 3 von 5 CpGs für *hOCT4* bzw. ≥ 4 von 8 CpGs für *hNANOG* und *hGTL2* als abnorm galt. Es wurde festgestellt, dass CpG-Fehler insgesamt relativ häufig auftreten. Deshalb wurden Allele als normal definiert, wenn sie vollständig normal methyliert waren bzw. einen einzelnen CpG-Fehler aufwiesen. Sämtliche Allele mit mehr CpG-Fehlern, insgesamt aber weniger als 50 % falscher Methylierung, wurden als intermediär methyliert kategorisiert.

Statistische Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Version 22.0.0.0 durchgeführt. Für die Gruppenvergleiche wurden je nach Datenverteilung der Mann-Whitney-Test oder der ANOVA mit Bonferroni post hoc Test angewandt, wobei p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant betrachtet wurden. Für multiples Testen wurde die Bonferroni-Methode angewandt. Um die DBS-Daten auf prädiktive Werte hin zu untersuchen, wurde eine binäre logistische Regressionanalyse durchgeführt, wofür als Variablen der ART-Ausgang „Lebendgeburt / keine Schwangerschaft“ gegen die Co-Varianten normal methylierte Allele, intermediär methylierte Allele oder abnorm methylierte Allele für jedes Gen einzeln getestet wurde.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden verschiedene Projekte bearbeitet, die sich alle mit der Thematik Epimutationen humaner Keimzellen befassen, z. B.: wie sich Infertilität epigenetisch zeigt oder ob ART-Prozeduren eventuell Einfluss nehmen könnten auf das Epigenom humaner Keimzellen.

Ein Projekt ging der Frage nach, wie sich Spermien von Männern, die (mittels ART) ein Kind gezeugt hatten, von solchen Spermien epigenetisch unterscheiden würden, für die trotz ART keine Schwangerschaft etabliert werden konnte. Es wurde untersucht ob eventuell eine erhöhte Anzahl an Epimutationen den ART-Ausgang beeinflussen könnte. Dazu wurden zwei verschiedene Gruppen untersucht, eine Gruppe mit normalen Spermienparametern und eine mit OAT-Syndrom, also beeinträchtigter Spermienqualität. Beide Gruppen waren jeweils unterteilt in je eine Untergruppe mit Lebendgeburt und eine Untergruppe, bei der es zu keiner Schwangerschaft gekommen war. Dazu wurden vier verschiedene Gene mittels DBS untersucht.

Ein weiteres Projekt ging der Frage nach ob IMSI-selektierte Spermien epigenetisch besser wären als nach ICSI-Kriterien selektierte Spermien. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Anwesenheit von im Spermienkopf enthaltenen Vakuolen sich in einer veränderten DNA-Methylierung widerspiegeln würde. Dazu wurden mittels LD und Pyrosequenzierung drei geprägte Gene untersucht.

In einem dritten Projekt wurde der Einfluss von IVM auf die Etablierung und Aufrechterhaltung von Imprints in einzelnen humanen Oocyten getestet, indem wieder die DNA-Methylierung verschiedener geprägter und nicht geprägter Gene mittels LD und Pyrosequenzierung untersucht wurde.

3.1 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener ART-Prozeduren auf das humane Epigenom

3.1.1 DNA-Methylierungsmusteranalysen geprägter Gene in IMSI-selektierten Spermien und Untersuchungen zum potentiellen Einfluss von Spermienkopfvakuolen auf die DNA-Methylierung

Für die Untersuchung, ob IMSI-selektierte Spermien (IMSI+/+ Gruppe) ein besseres epigenetisches Profil aufweisen als Spermien, die unter Standard-ICSI-Bedingungen (ICSI Gruppe) selektiert wurden bzw. Spermien mit Vakuolen im Spermienkopf (IMSI– Gruppe) oder mit Vakuolen und abnormer Morphologie (IMSI-/- Gruppe), standen Proben von 20 verschiedenen fertilen Donoren zur Verfügung. Jede Probe enthielt 11 Spermien. Insgesamt wurden 880 Spermien untersucht: 440 IMSI+/+ Spermien, 220 IMSI– Spermien und je 110 IMSI-/- bzw. ICSI Spermien. Davon wurden für 235 Spermien für keines der hier untersuchten Gene Amplifikate erhalten. Für *hGTL2* und *hPEG3* mussten wegen Kontamination die Ergebnisse von 53 Spermien von der Auswertung ausgeschlossen werden. Insgesamt konnten die Ergebnisse von 743 sequenzierten Allelen von 592 Spermien ausgewertet werden (siehe Tabelle 3-1). Für die einzelnen Gene wurden unterschiedlich viele Amplifikate erhalten (siehe Tabelle 3-2). Am besten zu amplifizieren waren *hGTL2* und *hPEG3*, während *hLIT1* am schwierigsten zu amplifizieren war.

Tabelle 3-1: Übersicht Anzahl untersuchter Spermien und Anzahl verwendbarer Spermien für die Auswertung.

Gesamtzahl untersuchter Spermien	880 (100%)
Anzahl Spermien ohne Amplifikate	235 (26,70%)
Wegen Kontamination ausgeschlossene Spermien	53 (6,02%)
Für Auswertung verfügbare Spermien	592 (67,27%)

Tabelle 3-2: Übersicht der Anzahl der je Gen amplifizierten Allele insgesamt und für die verschiedenen Gruppen.

	Gesamtzahl Allele	IMSI +/+ Allele	IMSI – Allele	IMSI -/- Allele	ICSI Allele
<i>hGTL2</i>	336 (45,22%)	169	57	36	74
<i>hLIT1</i>	104 (14,00%)	54	20	5	25
<i>hPEG3</i>	303 (40,78%)	159	43	32	69
Gesamt	743	382	120	73	168

Für die meisten Spermien konnte jeweils nur ein Gen amplifiziert werden, aber für einen geringen Teil konnten von einem Spermium auch mehrere Gene amplifiziert werden (siehe Tabelle 3-3). Für die Gruppe ICSI wurden insgesamt mehr Spermien analysiert als theoretisch vorhanden sein sollten. Das erklärt sich dadurch, dass während der Spermienansammlung gelegentlich mehr als nur 11 Spermien je Probe transferiert wurden (z. B. wenn die Kanülenspitze abbrach und darin noch weitere Spermien enthalten waren).

Tabelle 3-3: Übersicht der je Spermium amplifizierten Anzahl an Genen.

	Gesamtzahl Spermien	IMSI +/+ Spermien	IMSI – Spermien	IMSI -/- Spermien	ICSI Spermien
3 Gene /Spermium amplifiziert	21 (3,55 %)	14 (4,78%)	1 (0,91%)	0	6 (4,76%)
2 Gene /Spermium amplifiziert	109 (18,41%)	61 (20,82%)	8 (7,27%)	10 (15,87%)	30 (23,81%)
1 Gen /Spermium amplifiziert	462 (78,04%)	218 (74,40%)	101 (91,82%)	53 (84,13%)	90 (71,43%)
Gesamtpermienanzahl und Effizienz	592 592 / 880 = 67,27%	293 293 / 440 = 66,59%	110 110 / 220 = 50,00%	63 63 / 110 = 57,27%	126 (126 / 110)

Abnorme Allele zeigten für $\geq 50\%$ der analysierten CpGs eines Allels die dem Normalzustand entgegengesetzte Methylierung. CpG-Fehler-Allele zeigten für einzelne CpGs falsche Methylierung, wobei $< 50\%$ der analysierten CpGs des Allels betroffen waren, weshalb das Allel insgesamt betrachtet normal methyliert war. Die Gene *hLIT1* und *hPEG3* liegen in Spermien unmethyliert vor und *hGTL2* ist methyliert.

Insgesamt wurden relativ wenig abnorm methylierte Allele detektiert, wobei die meisten abnormen Allele für das paternal methylierte Gen *hGTL2* gefunden wurden. Diese traten in allen untersuchten Spermiengruppen auf mit 6 abnormen Allelen in der IMSI+/+ Gruppe, 3 abnormen Allelen in der ICSI Gruppe und jeweils 2 abnormen Allelen in den Gruppen IMSI– und IMSI-/. Vereinzelt wurden auch abnorme Allele für das paternal exprimierte *hPEG3* identifiziert, wovon 2 Allele in der IMSI+/+ Gruppe auftraten und 1 Allel in der ICSI Gruppe. Für das paternal exprimierte *hLIT1* wurde kein einziges abnormes Allel gefunden (siehe Abbildung 3-1). Jedes der detektierten abnormen Allele stammte aus unterschiedlichen Spermien und für solche Spermien, für die mehr als ein Gen amplifiziert werden konnte, zeigte sich nur ein abnormes Allel je Spermium (siehe Abbildung 3-3). Des Weiteren wurden auch einige Allele mit CpG-Fehlern gefunden, auch hier wieder hauptsächlich für *hGTL2* und jeweils ein

hLIT1-Allel in der IMSI- Gruppe und ein *hPEG3*-Allel in der IMSI-/- Gruppe (siehe Abbildung 3-2). Auch hier wurden in solchen Spermien mit Amplifikaten mehrerer Gene wieder nur für ein Gen ein CpG-Fehler-Allel gefunden, während die Allele der anderen Gene vollständig normal methyliert waren (siehe Abbildung 3-3). Der Großteil der analysierten Allele zeigte ein vollständig normales Methylierungsmuster (siehe Abbildung 3-4, Abbildung 3-5, Abbildung 3-6). Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 3-4 wiedergegeben. Einen statistischen Gruppenunterschied gab es nicht, weder in Hinblick auf die Häufigkeit abnorm methylierter Allele noch hinsichtlich der Häufigkeit von CpG-Fehlern (siehe Tabelle 3-5). Für die Berechnung der CpG-Fehlerrate wurden sämtliche normal methylierten CpGs mit allen CpG-Fehlern verglichen, unter Ausschluss aller abnorm methylierten Allele. Auch eine genauere Betrachtung der CpG-Fehlerrate zeigte keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Spermengruppen (siehe Tabelle 3-6).

Gruppe	Gen	Abnorme Methylierung
IMSI + / +	<i>hGTL2</i>	IMSI+/+34-8H
		IMSI+/+15-2G
		IMSI+/+7-5A
		IMSI+/+1-6D
		IMSI+/+33-2H
		IMSI+/+16-7A
	<i>hPEG3</i>	IMSI+/+1-5G
		IMSI+/+1-6G
IMSI -	<i>hGTL2</i>	IMSI- 5-5F
		IMSI- 14-10G
IMSI - / -	<i>hGTL2</i>	IMSI- /- 3-5H
		IMSI- /- 8-11F
ICSI	<i>hGTL2</i>	ICSI 6-7E
		ICSI 1-2F
		ICSI 2-1G
	<i>hPEG3</i>	ICSI 6-8E

Abbildung 3-1: Abnorm methylierte Allele für *hGTL2* und *hPEG3* der verschiedenen Spermengruppen.

Für *hLIT1* wurde kein abnormes Allel gefunden. Abnorme Allele zeigen für $\geq 50\%$ der analysierten CpGs eines Allels das dem normalen Methylierungszustand entgegengesetzte Methylierungsmuster. Jeder Kreis repräsentiert ein eigenes CpG. Weiße Kreise stellen unmethylierte CpGs dar, schwarz ausgefüllte Kreise stehen für methylierte CpGs. Die Bezeichnung der dargestellten Allele gibt die Spermengruppe an, danach die Probennummer und das Allel.

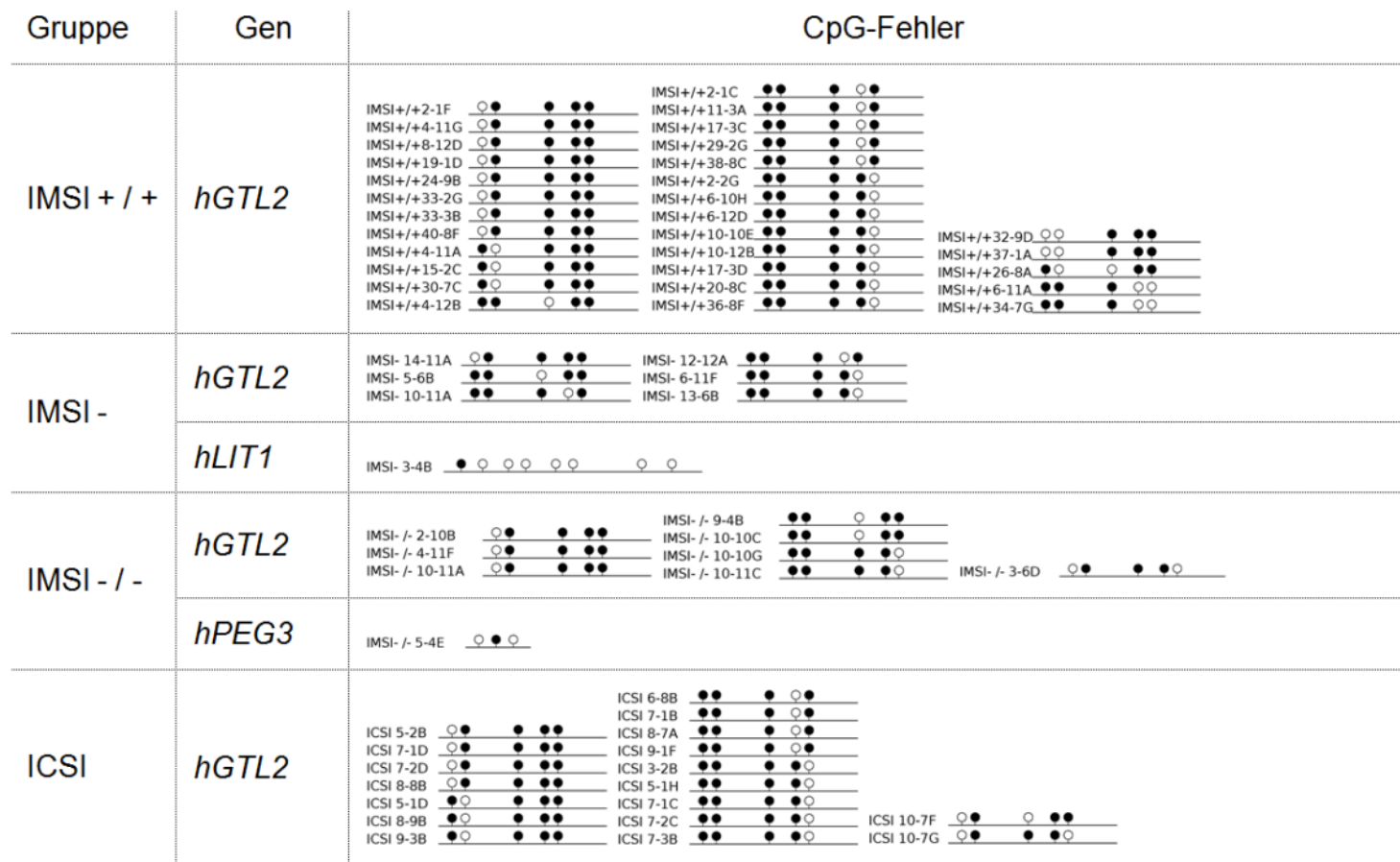


Abbildung 3-2: Identifizierte CpG-Fehler-Allele der verschiedenen Spermengruppen.

Im Falle von CpG-Fehlern ist nur 1 CpG (oder selten 2 CpGs) falsch methyliert, während > 50% der restlichen CpGs des Allels ein normales Methylierungsmuster zeigen, weshalb das Allel insgesamt als normal methyliert zu werten ist.

Gruppe	<i>hGTL2</i>	<i>hLIT1</i>	<i>hPEG3</i>
IMSI +/+	IMSI+/+1-6G ●● ● ●●		IMSI+/+1-6G ●●○
	IMSI+/+2-1F ○● ● ●●		IMSI+/+2-1F ○○○
	IMSI+/+2-2G ●● ● ●○	IMSI+/+2-2G ○ ○	IMSI+/+2-2G ○○○
	IMSI+/+6-12D ●● ● ●○	IMSI+/+6-12D ○ ○	
	IMSI+/+15-2C ●○ ● ●●	IMSI+/+15-2C ○○ ○○ ○○ ○○ ○○ ○○	
	IMSI+/+24-9B ○● ● ●●		IMSI+/+24-9B ○○○
	IMSI+/+34-7G ●● ● ○○		IMSI+/+34-7G ○○○
	IMSI+/+37-1A ○○ ● ●●		IMSI+/+37-1A ○○○
IMSI -	IMSI- 6-11F ●● ● ●○		IMSI- 6-11F ○○○
	IMSI- /- 3-5H ○○ ○ ○○		IMSI- /- 3-5H ○○○
IMSI -/-	IMSI- /- 9-4B ●● ○ ●●		IMSI- /- 9-4B ○○○
	IMSI- /- 10-10C ●● ○ ●●		IMSI- /- 10-10C ○○○
	IMSI- /- 10-10G ●● ● ●○		IMSI- /- 10-10G ○○○
ICSI	ICSI 5-2B ○● ● ●●	ICSI 5-2B ○○ ○○ ○○ ○○ ○○ ○○ ○○	ICSI 5-2B ○○○
	ICSI 6-8B ●● ● ○●	ICSI 6-8B ○○ ○○ ○○ ○○ ○○ ○○ ○○	
	ICSI 7-1B ●● ● ○●	ICSI 7-1B ○ ○	
	ICSI 7-1C ●● ● ●○	ICSI 7-1C ○ ○	
	ICSI 7-2C ●● ● ●○		ICSI 7-2C ○○○
	ICSI 7-2D ○● ● ●●		ICSI 7-2D ○○○
	ICSI 8-7A ●● ● ○●		ICSI 8-7A ○○○
	ICSI 8-9B ●○ ● ●●		ICSI 8-9B ○○○
	ICSI 9-1F ●● ● ○●		ICSI 9-1F ○○○
	ICSI 9-3B ●○ ● ●●		ICSI 9-3B ○○○
	ICSI 10-7G ○● ● ●○		ICSI 10-7G ○○○

Abbildung 3-3: Spermien mit mehreren Amplifikaten verschiedener Gene.

Abnorm methylierte Allele oder CpG-Fehler-Allele traten immer nur für eines der Gene auf, während die Allele der anderen Gene vollständig normal methyliert waren.

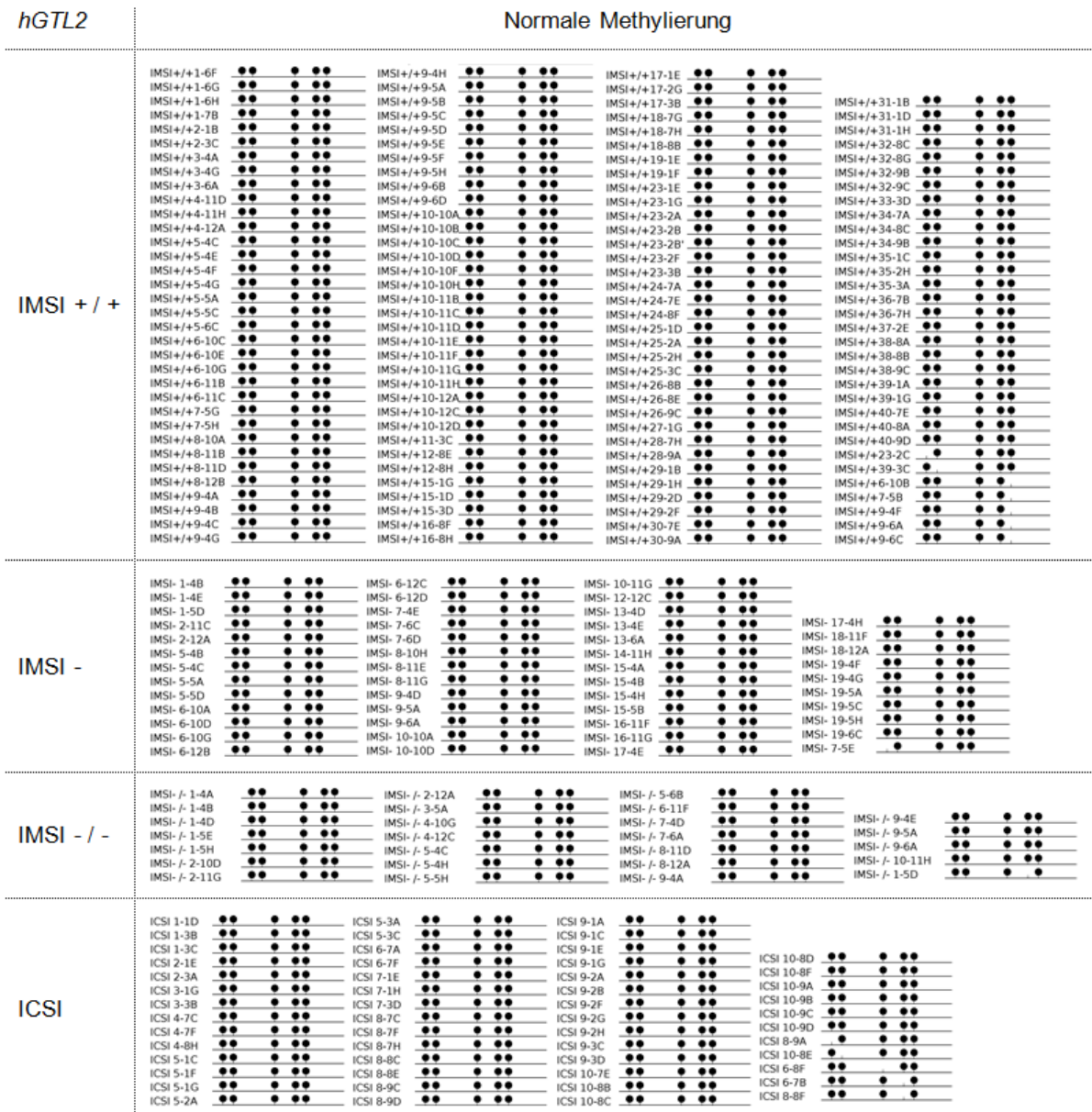


Abbildung 3-4: Normal methylierte *hGTL2*-Allele der verschiedenen Spermengruppen.

Bei CpG-Stellen, an denen nur ein Strich aber keine Kugel dargestellt ist, handelt es sich um einzelne CpGs mit intermediärer Methylierung, die von der Analyse ausgeschlossen wurden.

<i>h</i> PEG3	Normale Methylierung										
IMSI + / +	IMSI+/+1-6E	○○○	IMSI+/+7-5C	○○○	IMSI+/+10-12D	○○○	IMSI+/+23-2C	○○○			
	IMSI+/+1-7B	○○○	IMSI+/+7-5F	○○○	IMSI+/+11-1A	○○○	IMSI+/+23-2D	○○○			
	IMSI+/+2-1B	○○○	IMSI+/+7-6A	○○○	IMSI+/+11-1B	○○○	IMSI+/+23-2E	○○○			
	IMSI+/+2-1E	○○○	IMSI+/+8-10E	○○○	IMSI+/+11-1E	○○○	IMSI+/+23-2F	○○○	IMSI+/+34-7G	○○○	
	IMSI+/+2-1F	○○○	IMSI+/+8-11D	○○○	IMSI+/+11-1H	○○○	IMSI+/+23-3A	○○○	IMSI+/+35-1C	○○○	
	IMSI+/+2-1G	○○○	IMSI+/+9-4B	○○○	IMSI+/+11-3C	○○○	IMSI+/+23-3D	○○○	IMSI+/+35-2H	○○○	
	IMSI+/+2-2B	○○○	IMSI+/+9-4C	○○○	IMSI+/+12-9A	○○○	IMSI+/+24-7B	○○○	IMSI+/+35-3C	○○○	
	IMSI+/+2-2C	○○○	IMSI+/+9-4E	○○○	IMSI+/+15-1B	○○○	IMSI+/+24-7E	○○○	IMSI+/+35-3E	○○○	
	IMSI+/+2-2G	○○○	IMSI+/+9-4F	○○○	IMSI+/+15-2A	○○○	IMSI+/+24-9B	○○○	IMSI+/+36-7A	○○○	
	IMSI+/+2-2H	○○○	IMSI+/+9-4G	○○○	IMSI+/+15-3A	○○○	IMSI+/+25-1E	○○○	IMSI+/+36-7B	○○○	
	IMSI+/+2-3C	○○○	IMSI+/+9-4H	○○○	IMSI+/+15-3B	○○○	IMSI+/+25-1F	○○○	IMSI+/+36-7H	○○○	
	IMSI+/+3-5D	○○○	IMSI+/+9-5A	○○○	IMSI+/+16-7E	○○○	IMSI+/+25-3D	○○○	IMSI+/+36-8G	○○○	
	IMSI+/+3-5F	○○○	IMSI+/+9-5B	○○○	IMSI+/+16-8B	○○○	IMSI+/+26-9A	○○○	IMSI+/+36-9A	○○○	
	IMSI+/+3-5G	○○○	IMSI+/+9-5C	○○○	IMSI+/+16-8F	○○○	IMSI+/+26-9B	○○○	IMSI+/+36-9B	○○○	
	IMSI+/+3-6B	○○○	IMSI+/+9-5D	○○○	IMSI+/+16-8H	○○○	IMSI+/+27-1A	○○○	IMSI+/+36-9B	○○○	
	IMSI+/+4-10A	○○○	IMSI+/+9-5E	○○○	IMSI+/+16-9D	○○○	IMSI+/+29-3C	○○○	IMSI+/+37-1C	○○○	
	IMSI+/+4-10D	○○○	IMSI+/+9-5G	○○○	IMSI+/+17-1E	○○○	IMSI+/+30-7A	○○○	IMSI+/+37-1A	○○○	
	IMSI+/+4-10F	○○○	IMSI+/+9-5H	○○○	IMSI+/+17-2C	○○○	IMSI+/+30-7E	○○○	IMSI+/+37-1C	○○○	
	IMSI+/+4-12A	○○○	IMSI+/+9-6B	○○○	IMSI+/+17-2F	○○○	IMSI+/+30-9A	○○○	IMSI+/+37-1G	○○○	
	IMSI+/+5-4D	○○○	IMSI+/+9-6C	○○○	IMSI+/+17-3B	○○○	IMSI+/+31-2D	○○○	IMSI+/+37-2H	○○○	
	IMSI+/+5-4F	○○○	IMSI+/+9-6D	○○○	IMSI+/+18-7A	○○○	IMSI+/+32-7D	○○○	IMSI+/+38-7D	○○○	
	IMSI+/+5-5G	○○○	IMSI+/+10-10A	○○○	IMSI+/+18-7G	○○○	IMSI+/+32-7G	○○○	IMSI+/+38-7E	○○○	
	IMSI+/+6-10A	○○○	IMSI+/+10-10B	○○○	IMSI+/+18-8E	○○○	IMSI+/+32-8A	○○○	IMSI+/+38-7G	○○○	
	IMSI+/+6-10B	○○○	IMSI+/+10-10G	○○○	IMSI+/+19-2H	○○○	IMSI+/+32-8C	○○○	IMSI+/+38-7H	○○○	
	IMSI+/+6-10C	○○○	IMSI+/+10-10H	○○○	IMSI+/+20-8B	○○○	IMSI+/+32-8E	○○○	IMSI+/+39-1C	○○○	
	IMSI+/+6-10D	○○○	IMSI+/+10-11B	○○○	IMSI+/+21-2E	○○○	IMSI+/+32-8E	○○○	IMSI+/+39-2A	○○○	
	IMSI+/+6-10G	○○○	IMSI+/+10-11C	○○○	IMSI+/+22-8A	○○○	IMSI+/+33-1E	○○○	IMSI+/+39-2H	○○○	
	IMSI+/+6-11H	○○○	IMSI+/+10-11E	○○○	IMSI+/+23-1A	○○○	IMSI+/+33-2A	○○○	IMSI+/+39-3B	○○○	
	IMSI+/+6-12A	○○○	IMSI+/+10-11F	○○○	IMSI+/+23-1B	○○○	IMSI+/+33-2B	○○○	IMSI+/+40-7H	○○○	
	IMSI+/+7-4A	○○○	IMSI+/+10-11G	○○○	IMSI+/+23-1C	○○○	IMSI+/+33-2E	○○○	IMSI+/+40-8G	○○○	
	IMSI+/+7-4F	○○○	IMSI+/+10-11H	○○○	IMSI+/+23-1H	○○○	IMSI+/+33-2F	○○○	IMSI+/+40-9A	○○○	
	IMSI+/+7-4G	○○○	IMSI+/+10-12C	○○○	IMSI+/+23-2B	○○○	IMSI+/+34-7E	○○○	IMSI+/+5-4G	○○○	
	IMSI -	IMSI- 1-4C	○○○	IMSI- 6-10C	○○○	IMSI- 8-10F	○○○	IMSI- 13-4B'	○○○		
		IMSI- 1-5A	○○○	IMSI- 6-10D	○○○	IMSI- 9-6B	○○○	IMSI- 13-4C	○○○		
		IMSI- 1-5D	○○○	IMSI- 6-11C	○○○	IMSI- 10-11C	○○○	IMSI- 13-4F	○○○	IMSI- 15-4F	○○○
		IMSI- 1-5E	○○○	IMSI- 6-11F	○○○	IMSI- 10-11G	○○○	IMSI- 13-5B	○○○	IMSI- 16-10F	○○○
		IMSI- 2-10C	○○○	IMSI- 6-11H	○○○	IMSI- 11-4H	○○○	IMSI- 13-5C	○○○	IMSI- 16-12A	○○○
IMSI- 2-10F		○○○	IMSI- 6-12C	○○○	IMSI- 12-10A	○○○	IMSI- 13-6D	○○○	IMSI- 18-12A	○○○	
IMSI- 5-4A		○○○	IMSI- 6-12D	○○○	IMSI- 12-11G	○○○	IMSI- 14-11H	○○○	IMSI- 19-5D	○○○	
IMSI- 5-4H		○○○	IMSI- 7-5B	○○○	IMSI- 13-4A	○○○	IMSI- 14-12B	○○○	IMSI- 20-12C	○○○	
IMSI- 5-5D		○○○	IMSI- 8-10D	○○○	IMSI- 13-4B	○○○	IMSI- 14-12C	○○○	IMSI- 13-4G	○○○	
IMSI - / -		IMSI- /- 1-5C	○○○	IMSI- /- 4-10H	○○○	IMSI- /- 7-4C	○○○	IMSI- /- 8-12A	○○○		
	IMSI- /- 2-11B	○○○	IMSI- /- 5-4F	○○○	IMSI- /- 7-5D	○○○	IMSI- /- 9-4B	○○○			
	IMSI- /- 2-11C	○○○	IMSI- /- 5-4G	○○○	IMSI- /- 7-6D	○○○	IMSI- /- 9-4E	○○○			
	IMSI- /- 2-12A	○○○	IMSI- /- 5-5A	○○○	IMSI- /- 8-10E	○○○	IMSI- /- 9-6A	○○○			
	IMSI- /- 3-5G	○○○	IMSI- /- 5-6A	○○○	IMSI- /- 8-10G	○○○	IMSI- /- 10-10C	○○○	IMSI- /- 10-10G	○○○	
	IMSI- /- 3-5H	○○○	IMSI- /- 6-10E	○○○	IMSI- /- 8-11C	○○○	IMSI- /- 10-10D	○○○	IMSI- /- 2-10H	○○○	
	IMSI- /- 3-6B	○○○	IMSI- /- 6-11H	○○○	IMSI- /- 8-11D	○○○	IMSI- /- 10-10E	○○○	IMSI- /- 5-4H	○○○	
ICSI	ICSI 1-1B	○○○	ICSI 4-8F	○○○	ICSI 6-9D	○○○	ICSI 8-8D	○○○			
	ICSI 1-1F	○○○	ICSI 4-8H	○○○	ICSI 7-1A	○○○	ICSI 8-8F	○○○			
	ICSI 1-2C	○○○	ICSI 4-9A	○○○	ICSI 7-1G	○○○	ICSI 8-9A	○○○	ICSI 9-3C	○○○	
	ICSI 2-1D	○○○	ICSI 4-9D	○○○	ICSI 7-1H	○○○	ICSI 8-9B	○○○	ICSI 9-3D	○○○	
	ICSI 2-1F	○○○	ICSI 5-1C	○○○	ICSI 7-2A	○○○	ICSI 9-1A	○○○	ICSI 10-7A	○○○	
	ICSI 2-2B	○○○	ICSI 5-1F	○○○	ICSI 7-2C	○○○	ICSI 9-1D	○○○	ICSI 10-7D	○○○	
	ICSI 2-2H	○○○	ICSI 5-2B	○○○	ICSI 7-2D	○○○	ICSI 9-1F	○○○	ICSI 10-7G	○○○	
	ICSI 2-3B	○○○	ICSI 5-2D	○○○	ICSI 7-2G	○○○	ICSI 9-1G	○○○	ICSI 10-7H	○○○	
	ICSI 3-1B	○○○	ICSI 5-2F	○○○	ICSI 7-2H	○○○	ICSI 9-2A	○○○	ICSI 10-8A	○○○	
	ICSI 3-2C	○○○	ICSI 5-2H	○○○	ICSI 7-3D	○○○	ICSI 9-2D	○○○	ICSI 10-8C	○○○	
	ICSI 4-7A	○○○	ICSI 5-3D	○○○	ICSI 8-7A	○○○	ICSI 9-2F	○○○	ICSI 10-8D	○○○	
	ICSI 4-7H	○○○	ICSI 6-8A	○○○	ICSI 8-7H	○○○	ICSI 9-2G	○○○	ICSI 10-8F	○○○	
	ICSI 4-8B	○○○	ICSI 6-8H	○○○	ICSI 8-8A	○○○	ICSI 9-2H	○○○	ICSI 10-8B	○○○	
	ICSI 4-8E	○○○	ICSI 6-9B	○○○	ICSI 8-8C	○○○	ICSI 9-3B	○○○	ICSI 10-7C	○○○	

Abbildung 3-5: Normal methylierte *h*PEG3-Allele der verschiedenen Spermengruppen.

Bei CpG-Stellen, an denen nur ein Strich aber keine Kugel dargestellt ist, handelt es sich um einzelne CpGs mit intermediärer Methylierung, die von der Analyse ausgeschlossen wurden.

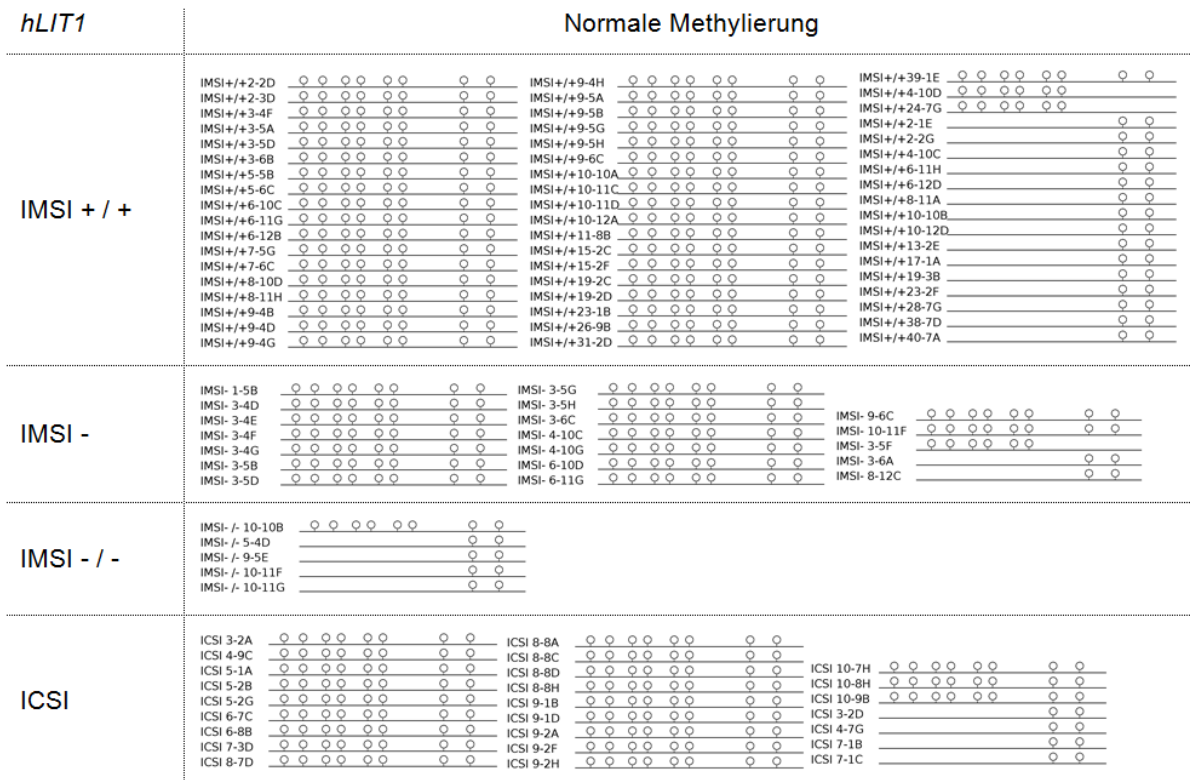


Abbildung 3-6: Normal methylierte *hLIT1*-Allele der verschiedenen Spermengruppen.

Die Methylierung von *hLIT1* wurde mit zwei verschiedenen Pyroassays untersucht. Es konnten jedoch nicht für alle Allele vollständige Ergebnisse erhalten werden, weshalb für manche Lollipopdiagramme nur 6 CpGs bzw. 2 CpGs dargestellt sind, je nachdem welcher der beiden Assays erfolgreich war.

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Methylierungszustände der untersuchten Allele.

	Methylierung	<i>hGTL2</i>	<i>hLIT1</i>	<i>hPEG3</i>	Alle Gene
IMSI +/+	Normale Allele	133	54	157	344
	CpG-Fehler	30 (17,75%)	0	0	30 (7,85%)
	Abnorme Allele	6 (3,55%)	0	2 (1,26%)	8 (2,09%)
IMSI -	Normale Allele	49	19	43	111
	CpG-Fehler	6 (10,53%)	1 (5,00%)	0	7 (5,83%)
	Abnorme Allele	2 (3,51%)	0	0	2 (1,67%)
IMSI -/-	Normale Allele	26	5	31	62
	CpG-Fehler	8 (22,22%)	0	1 (3,13%)	9 (12,33%)
	Abnorme Allele	2 (5,56%)	0	0	2 (2,74%)
ICSI	Normale Allele	53	25	68	146
	CpG-Fehler	18 (24,32%)	0	0	18 (10,71%)
	Abnorme Allele	3 (4,05%)	0	1 (1,45%)	4 (2,38%)
Alle nicht-(IMSI +/-) Gruppen	Normale Allele	128	49	142	319
	CpG-Fehler	32 (19,16%)	1 (2,00%)	1 (0,69%)	34 (9,42%)
	Abnorme Allele	7 (4,19%)	0	1 (0,69%)	8 (2,22%)

Tabelle 3-5: p-Werte des Vergleichs verschiedener Spermengruppen hinsichtlich Abnormalität und Häufigkeit von CpG-Fehlern.

Vergleich der IMSI+/+ Spermengruppe mit den einzelnen nicht-(IMSI+/+)-Gruppen bzw. mit allen nicht-(IMSI+/+)-Gruppen zusammengefasst. P-Werte wurden mit Fisher's Exact Test berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ sind signifikant. Wo keine p-Werte angegeben sind (-), wurden keinerlei fehlerhaften Allele detektiert.

	Gen	Methylierung	Alle nicht-(IMSI +/+) Gruppen	IMSI -	IMSI -/-	ICSI
IMSI +/+	<i>hGTL2</i>	CpG-Fehler	0,7781	0,2162	0,4802	0,2904
		Abnorm	0,7854	1,0000	0,6319	1,0000
	<i>hLIT1</i>	CpG-Fehler	0,4808	0,2703	-	-
		Abnorm	-	-	-	-
	<i>hPEG3</i>	CpG-Fehler	0,4767	-	0,1693	-
		Abnorm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Alle Gene	CpG-Fehler	0,6905	0,5510	0,2490	0,3238
		Abnorm	1,0000	1,0000	0,6660	0,7623

Tabelle 3-6: CpG-Fehler-Ratio für die verschiedenen untersuchten Gene im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Spermengruppen.

Die p-Werte wurden mit Fisher's Exact Test berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant. Für die CpG-Fehlerrate wurden sämtliche abnorm methylierten Allele von der Berechnung ausgeschlossen. Wenn kein CpG-Fehler vorlag wurde kein p-Wert berechnet (-). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen IMSI+/+ Spermien und den anderen untersuchten Spermengruppen.

Gen		IMSI +/+	IMSI -	IMSI -/-	ICSI	Alle nicht-(IMSI +/+) Gruppen
<i>hGTL2</i>	Allelanzahl normal: CpG-Fehler	133:30	49:6	26:8	53:18	128:32
	CpG-Fehler Ratio: Anzahl CpGs normal: CpG-Fehler	778:35	268:6	161:8	330:20	759:34
	p-Wert CpG-Fehler Ratio IMSI +/+ gegen nicht-(IMSI+/+)		0,1417	0,8360	0,2953	1,0000
<i>hLIT1</i>	Allelanzahl normal: CpG-Fehler	54:0	19:1	5:0	25:0	49:1
	CpG-Fehler Ratio: Anzahl CpGs normal: CpG-Fehler	338:0	145:1	16:0	176:0	337:1
	p-Wert CpG-Fehler Ratio IMSI +/+ gegen nicht-(IMSI+/+)		0,3017	-	-	1,0000
<i>hPEG3</i>	Allelanzahl normal: CpG-Fehler	157:0	43:0	31:1	68:0	142:1
	CpG-Fehler Ratio: Anzahl CpGs normal: CpG-Fehler	470:0	128:0	93:1	203:0	424:1
	p-Wert CpG-Fehler Ratio IMSI +/+ gegen nicht-(IMSI+/+)		-	0,1667	-	0,4749
Alle Gene	Allelanzahl normal: CpG-Fehler	344:30	111:7	62:9	146:18	319:34
	CpG-Fehler Ratio: Anzahl CpGs normal: CpG-Fehler	1586:35	541:7	270:9	709:20	1520:36
	p-Wert CpG-Fehler Ratio IMSI +/+ gegen nicht-(IMSI+/+)		0,2805	0,2798	0,3796	0,8108

Auffällig war, dass *hGTL2* scheinbar anfälliger für CpG-Fehler ist als die anderen beiden hier untersuchten Gene. Um zu überprüfen, ob *hGTL2* mehr CpG-Fehler aufweist, wurden die CpG-Fehlerraten von *hLIT1* und *hPEG3* mit der für *hGTL2* vergli-

chen, jeweils für alle hier untersuchten Spermengruppen. Über alle Gruppen hinweg zeigte sich, dass *hGTL2* mehr CpG-Fehler aufweist als die anderen Gene (siehe Tabelle 3-7). Einzig für die IMSI-/- Gruppe wurde keine Signifikanz erreicht.

Tabelle 3-7: Erhöhte CpG-Fehlerrate für *hGTL2*.

Vergleich der CpG-Fehlerraten von *hGTL2* mit *hLIT1* und *hPEG3*. Die p-Werte wurden wieder mittels Fisher's Exact Test berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant.

Gen		IMSI +/-	IMSI -	IMSI -/-	ICSI	Alle nicht- (IMSI +/-) Gruppen	Alle Gruppen
<i>hGTL2</i>	CpG-Fehler Ratio normal: Fehler	778:35	268:6	161:8	330:20	759:34	1537:69
<i>hLIT1</i>	CpG-Fehler Ratio normal: Fehler	338:0	145:1	16:0	176:0	337:1	675:1
	p-Wert CpG-Fehler <i>hGTL2: hLIT1</i>	0,0001	0,0315	1,000	0,0013	0,0001	0,0001
<i>hPEG3</i>	CpG-Fehler Ratio normal: Fehler	470:0	128:0	93:1	203:0	424:1	894:1
	p-Wert CpG-Fehler <i>hGTL2: hPEG3</i>	0,0001	0,0099	0,1652	0,0008	0,0001	0,0001

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass es keinen Unterschied zwischen IMSI- und ICSI-selektierten Spermien hinsichtlich der Häufigkeit von Epimutationen oder CpG-Fehlern gab. Auch zwischen Spermien ohne Vakuolen und Spermien mit Vakuolen oder Spermien mit Vakuolen sowie abnormer Morphologie konnte kein epigenetischer Unterschied gefunden werden. Lediglich für *hGTL2* wurden in allen hier untersuchten Spermengruppen mehr CpG-Fehler als für die anderen untersuchten Gene gefunden.

3.1.2 Untersuchungen zur DNA-Methylierung verschiedener geprägter und nicht geprägter Gene in humanen Einzeloocyten und der potentiellen Beeinflussung dieser durch IVM

Zur Untersuchung des potentiellen Einflusses von IVM auf die Etablierung und Aufrechterhaltung von Imprints wurden die DNA-Methylierungsmuster einzelner humaner Oocyten für vier geprägte Gene und drei nicht geprägte Gene an bisulfitkonvertierter DNA mittels LD und anschließender Pyrosequenzierung untersucht. Die untersuchten geprägten Gene waren dabei das maternal exprimierte Gen *hGTL2* sowie

die paternal exprimierten Gene *hLIT1*, *hPEG3* und *hSNRPN*. Nicht geprägt waren die beiden Pluripotenzgene *hNANOG* und *hOCT4* sowie die oocyten-spezifische DNMT3L-Isoform *hDNMT3Lo*, die in Oocyten unmethyliert sind und als Marker für somatische Kontamination dienen. Diese Markergene sind in somatischen Zellen alle methyliert. Da Oocyten von Cumuluszellen umgeben sind, ist es bei der Proben-sammlung von enormer Bedeutung, dass diese Zellen vor der Untersuchung gründlich entfernt werden, da somatische Kontamination ansonsten fälschlicherweise als Epimutation interpretiert werden könnte. Um zusätzlich sicherzugehen, dass somatische Kontamination ausgeschlossen werden kann, wurden die drei genannten nicht geprägten Gene in den Oocyten-Assay integriert.

Für die IVM-Gruppe standen 90 einzelne Oocyten von 19 verschiedenen PCOS-Patientinnen zur Verfügung, von denen 15 Oocyten nach IVM das MII-Stadium erreicht hatten und 75 Oocyten unreif (GV, MI) vorlagen. Als Kontrollgruppe standen insgesamt 49 *in vivo* gereifte Oocyten von 5 PCOS-Patientinnen und 2 nicht-PCOS-Patientinnen zur Verfügung, wovon 19 Oocyten reif und 30 unreif waren. Von den insgesamt 139 analysierten einzelnen humanen Oocyten wurden nur für 15 Oocyten keine Amplifikate erhalten. Für die verbliebenen 124 Oocyten mussten weitere 15 Oocyten wegen somatischer Kontamination ausgeschlossen werden. Es verblieben für die endgültige Auswertung 71 IVM-Oocyten (59 unreife, 12 reife) und 38 *In-vivo*-Oocyten (23 unreife, 15 reife). Diese Werte sind in Tabelle 3-8 dargestellt.

Tabelle 3-8: Übersicht der untersuchten und von der Analyse ausgeschlossenen humanen Oocyten.

	Summe	IVM	<i>in vivo</i>
Ausgangsmenge analysierter Oocyten	139	90	49
Ausschluss aus Analyse wegen fehlender Amplifikate	15 (10,79%)	10 (11,11%)	5 (10,20%)
Ausschluss aus Analyse wegen somatischer Kontamination	15 (12,09%)	9 (11,25%)	6 (13,64%)
Verbliebene Anzahl an Oocyten	109 (87,90%) Unreif: 82 Reif: 27	71 (88,75%) Unreif: 59 Reif: 12	38 (86,36%) Unreif: 23 Reif: 15

Für die meisten Oocyten (82 Oocyten) konnten 3 bis 5 Gene amplifiziert und analysiert werden, für einen geringeren Anteil wurden nur 1 bis 2 Gene amplifiziert und analysiert (21 Oocyten) und für 6 Oocyten konnten 6 der 7 im Assay enthaltenen Gene analysiert werden, wie in Tabelle 3-9 nochmals genauer ausgeführt ist. Sowohl geprägte als auch nicht geprägte Gene konnten dabei für den Großteil der unter-

suchten Oocyten (92 Oocyten) gleichzeitig amplifiziert werden, wie in Tabelle 3-10 genauer aufgeführt ist. Lediglich für 8 Oocyten wurden ausschließlich nicht geprägte Gene amplifiziert und von 9 Oocyten ausschließlich geprägte Gene.

Tabelle 3-9: Übersicht der Anzahl pro Oocyte amplifizierter Gene.

Anzahl Gene je Oocyte	IVM + <i>in vivo</i>	IVM			<i>in vivo</i>		
	Summe Oocyten	Unreife Oocyten	Reife Oocyten	Summe Oocyten	Unreife Oocyten	Reife Oocyten	Summe Oocyten
1	11 (10,09%)	7 (11,86%)	0	7 (9,86%)	1 (4,35%)	3 (20,00%)	4 (10,53%)
2	10 (9,17%)	7 (11,86%)	1 (8,33%)	8 (11,27%)	1 (4,35%)	1 (6,67%)	2 (5,26%)
3	19 (17,43%)	14 (23,73%)	1 (8,33%)	15 (21,13%)	3 (13,04%)	1 (6,67%)	4 (10,53%)
4	37 (33,94%)	17 (28,81%)	4 (33,33%)	21 (29,58%)	8 (34,78%)	8 (53,33%)	16 (42,11%)
5	26 (23,85%)	13 (22,03%)	3 (25,00%)	16 (22,54%)	8 (34,78%)	2 (13,33%)	10 (26,32%)
6	6 (5,50%)	1 (1,69%)	3 (25,00%)	4 (5,63%)	2 (8,70%)	0	2 (5,26%)
7	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3-10: Amplifikation geprägter Gene oder nicht geprägter Markergene oder Amplifikation beider Gruppen pro Oocyte.

Gene	IVM + <i>in vivo</i>	IVM			<i>in vivo</i>		
	Summe Oocyten	Unreife Oocyten	Reife Oocyten	Summe Oocyten	Unreife Oocyten	Reife Oocyten	Summe Oocyten
Nur Markergene amplifiziert	8 (7,34%)	5 (8,47%)	0	5 (7,04%)	1 (4,35%)	2 (13,33%)	3 (7,89%)
Nur geprägte Gene amplifiziert	9 (8,26%)	8 (13,56%)	0	8 (11,27%)	0	1 (6,67%)	1 (2,63%)
Beide Gengruppen amplifiziert	92 (84,40%)	46 (77,97%)	12 (100,00%)	58 (81,69%)	22 (95,65%)	12 (80,00%)	34 (89,47%)

Für die verschiedenen Gene wurden unterschiedliche Amplifikationseffizienzen erzielt. Für die nicht geprägten Gene konnte *hDNMT3Lo* für 79 Oocyten amplifiziert werden, *hNANOG* wurde von 76 Oocyten amplifiziert und *hOCT4*-Amplifikate wurden für 55 Oocyten erhalten. Für die geprägten Gene wurden die besten Ergebnisse für *hGTL2* erhalten, das für 91 Oocyten amplifiziert werden konnte, gefolgt von *hPEG3* mit Amplifikaten für 50 Oocyten. Für die Gene *hSNRPN* und *hLIT1* wurden weniger Allele amplifiziert mit *hSNRPN*-Amplifikaten für 34 Oocyten und *hLIT1*-Amplifikaten für lediglich 17 Oocyten. Eine genauere Auflistung der Amplifikationseffizienzen ist in Tabelle 3-11 dargestellt.

Tabelle 3-11: Amplifikationseffizienzen der einzelnen untersuchten Gene.

Gene	IVM + <i>in vivo</i>	IVM			<i>in vivo</i>		
	Summe Oocyten	Unreife Oocyten	Reife Oocyten	Summe Oocyten	Unreife Oocyten	Reife Oocyten	Summe Oocyten
<i>hDNMT3Lo</i>	79 (72,48%)	41 (69,49%)	10 (83,33%)	51 (71,83%)	18 (78,26%)	10 (66,67%)	28 (73,68%)
<i>hNANOG</i>	76 (69,72%)	40 (67,80%)	8 (66,67%)	48 (67,61%)	19 (82,61%)	9 (60,00%)	28 (73,68%)
<i>hOCT4</i>	55 (50,46%)	28 (47,46%)	7 (58,33%)	35 (49,30%)	12 (52,17%)	8 (53,33%)	20 (52,63%)
<i>hGTL2</i>	91 (83,49%)	49 (83,05%)	11 (91,67%)	60 (84,51%)	20 (86,96%)	11 (73,33%)	31 (81,58%)
<i>hPEG3</i>	50 (45,87%)	21 (35,59%)	9 (75,00%)	30 (42,25%)	12 (52,17%)	8 (53,33%)	20 (52,63%)
<i>hSNRPN</i>	34 (31,19%)	15 (25,42%)	6 (50,00%)	21 (29,58%)	9 (39,13%)	4 (26,67%)	13 (34,21%)
<i>hLIT1</i>	17 (15,60%)	8 (13,56%)	3 (25,00%)	11 (15,49%)	6 (26,09%)	0	6 (15,79%)

Sowohl in der IVM-Gruppe als auch in der *In-vivo*-Kontrollgruppe konnten neben den normal methylierten Allelen auch solche mit CpG-Fehler oder abnormer Methylierung detektiert werden. Ein Allel wurde als abnorm gewertet, wenn $\geq 50\%$ der analysierten CpGs nicht das für das untersuchte Gen normale Methylierungsmuster zeigten. In der Oocyte liegen die Gene *hGTL2*, *hDNMT3Lo*, *hNANOG* und *hOCT4* unmethyliert vor, während die Gene *hLIT1*, *hPEG3* und *hSNRPN* methyliert sind. Ein CpG-Fehler liegt vor, wenn vereinzelte CpGs die entgegengesetzte Methylierung zeigen, aber insgesamt dennoch $> 50\%$ der analysierten CpGs ein normales Methylierungsmuster tragen.

Für die hier untersuchten *In-vivo*-Oocyten konnten in der Gruppe der nicht geprägten Gene je 1 abnorm methyliertes Allel für *hOCT4* und eines für *hNANOG* detektiert werden, die aus unterschiedlichen Oocyten stammten (siehe Tabelle 3-12, Abbildung 3-8, Abbildung 3-9). Die beiden abnorm methylierten *hGTL2*-Allele (siehe Abbildung 3-10) sowie das eine abnorm methylierte *hPEG3*-Allel (siehe Abbildung 3-12) stammten ebenso aus unterschiedlichen Oocyten. Insgesamt wurden in der *In-vivo*-Gruppe sehr wenige epimutierte Allele detektiert. In der IVM-Gruppe waren nur innerhalb der Gruppe der geprägten Gene abnorm methylierte Allele zu finden: für *hGTL2* wurden 8 Allele detektiert (siehe Abbildung 3-10), für *hLIT1* 2 abnorme Allele (siehe Abbildung 3-11), für *hPEG3* waren es 3 Allele (siehe Abbildung 3-12) und für *hSNRPN* konnte 1 abnormes Allel gefunden werden (siehe Abbildung 3-13). Dabei wurde für eine Oocyte sowohl ein abnormes Methylierungsmuster für *hLIT1* als auch für *hPEG3* gefunden,

während alle anderen Oocyten, wenn überhaupt, nur ein abnorm methyliertes Allel hatten. Für *hDNMT3Lo* wurde in keiner der beiden Gruppen ein abnorm methyliertes Allel identifiziert (siehe Abbildung 3-7). Auch wenn die Anzahl der in den IVM-Oocyten detektierten Allele leicht erhöht zu sein scheint, wurde dennoch statistisch kein Unterschied zwischen der IVM- und der *In-vivo*-Gruppe gefunden (siehe Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12: Übersicht abnorm methylierter und normaler Allele im Vergleich IVM gegen *in vivo* gereifte Oocyten.

Bei den normalen Allelen wurde hier zunächst nicht unterschieden zwischen vollständig normal methylierten Allelen und solchen mit CpG-Fehlern. Des Weiteren wurden hier alle für unreife und reife Oocyten erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Fisher's Exact Test berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant. Für *hDNMT3Lo* wurden keine abnormen Allele gefunden und deshalb kein p-Wert berechnet (-).

Gene	IVM : <i>in vivo</i>	IVM		<i>in vivo</i>	
	p-Wert (Fisher's Exact Test)	Normale + CpG-Fehler Allele	Abnorme Allele	Normale + CpG-Fehler Allele	Abnorme Allele
<i>hDNMT3Lo</i>	-	81	0	40	0
<i>hNANOG</i>	0,4211	66	0	47	1 (2,08%)
<i>hOCT4</i>	0,3692	41	0	23	1 (4,17%)
<i>hGTL2</i>	0,3239	90	8 (8,16%)	56	2 (3,45%)
<i>hLIT1</i>	0,5294	10	2 (16,67%)	6	0
<i>hPEG3</i>	0,6222	33	3 (8,33%)	28	1 (3,45%)
<i>hSNRPN</i>	1,0000	20	1 (4,76%)	17	0

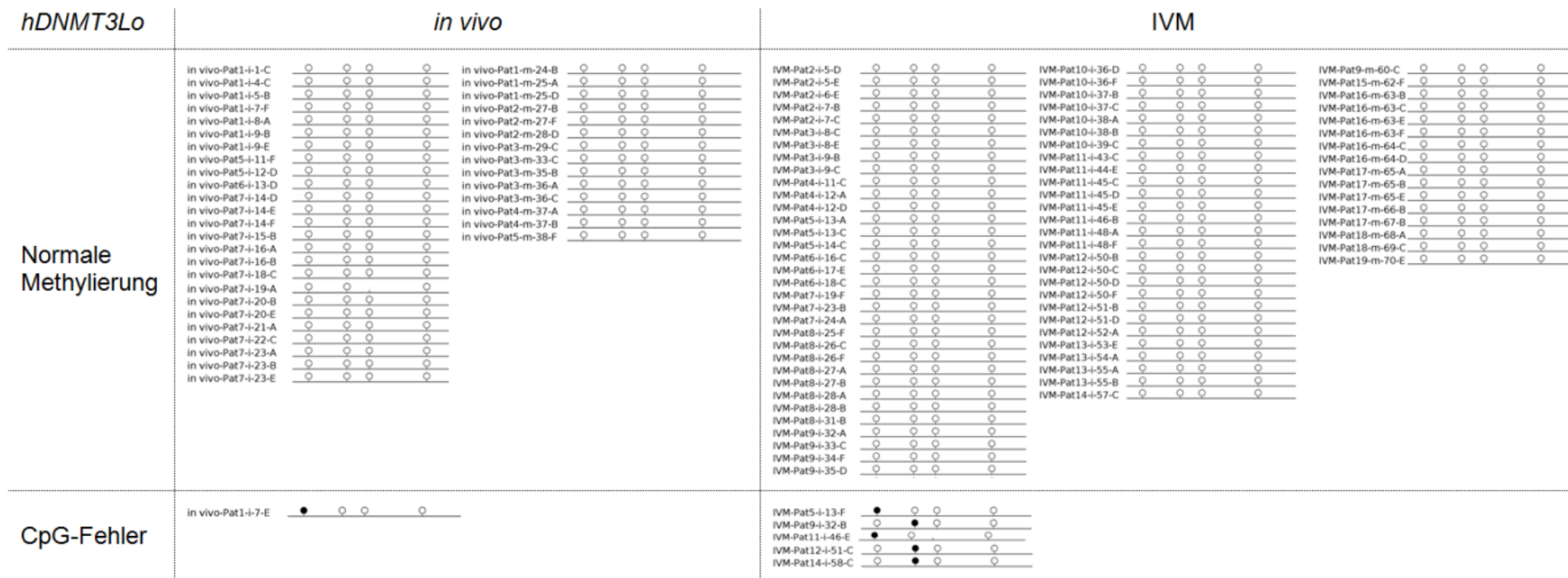


Abbildung 3-7: Lollipopdiagramme für *hDNMT3Lo*.

Für *hDNMT3Lo* konnten keine abnorm methylierten Allele gefunden werden. CpG-Fehler-Allele traten in beiden Gruppen auf. Dargestellt sind sämtliche analysierten Allele. Jeder Kreis steht für eines der sequenzierten CpGs des entsprechenden Allels. Leere weiße Kreise sind unmethyliert, während gefüllte Kreise methyliert sind. Fehlende Kreise stehen für ein einzelnes nicht eindeutig zuordenbares CpG (intermediärer Methylierungswert), welches von der Analyse ausgeschlossen wurde. Die Allelbeschriftung gibt die Gruppe (*in vivo*, IVM) an sowie die Patientennummer, den Reifeszustand (i –immature, unreif; m- mature, reif) gefolgt von der Nummer der Oocyte und des Allels (Buchstabenkennung).

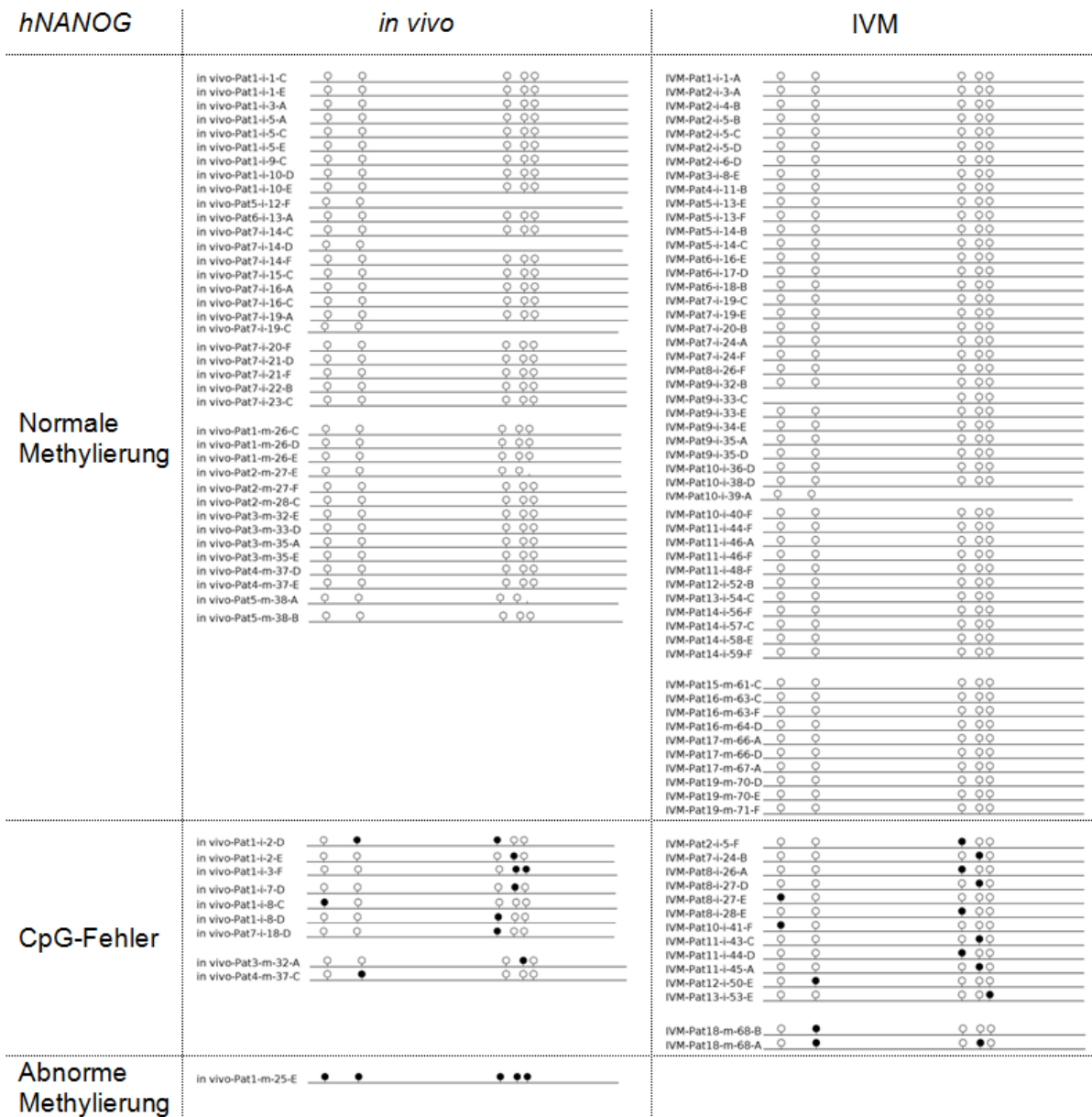


Abbildung 3-8: Lollipopdiagramme für *hNANOG*-Allele.

Hier wurde in der *In-vivo*-Gruppe, nicht jedoch in der IVM-Gruppe, ein abnormes Allel gefunden. In beiden Gruppen wurden CpG-Fehler identifiziert.

<i>hOCT4</i>	<i>in vivo</i>		IVM					
Normale Methylierung	in vivo-Pat1-i-1-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	in vivo-Pat1-m-26-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat2-i-5-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat15-m-61-F	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	in vivo-Pat1-i-6-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	in vivo-Pat3-m-29-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat2-i-7-B	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat16-m-63-A	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	in vivo-Pat1-i-9-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	in vivo-Pat3-m-30-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat4-i-11-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat18-m-69-A	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	in vivo-Pat1-i-10-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	in vivo-Pat3-m-34-A	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat5-i-13-F	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat19-m-71-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	in vivo-Pat5-i-12-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	in vivo-Pat4-m-37-D	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat5-i-14-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	in vivo-Pat7-i-15-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	in vivo-Pat5-m-38-B	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat6-i-16-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	in vivo-Pat7-i-15-F	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			IVM-Pat6-i-16-F	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	in vivo-Pat7-i-18-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			IVM-Pat8-i-28-A	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	in vivo-Pat7-i-19-A	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			IVM-Pat9-i-32-A	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	in vivo-Pat7-i-19-D	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			IVM-Pat9-i-35-D	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	in vivo-Pat7-i-21-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			IVM-Pat10-i-36-B	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	in vivo-Pat7-i-21-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			IVM-Pat10-i-37-F	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
	in vivo-Pat7-i-21-F	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			IVM-Pat11-i-44-C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
					IVM-Pat11-i-45-A	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
					IVM-Pat11-i-46-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
					IVM-Pat11-i-47-D	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
					IVM-Pat11-i-48-F	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
					IVM-Pat12-i-50-D	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
					IVM-Pat12-i-50-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
					IVM-Pat12-i-51-B	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
				IVM-Pat12-i-52-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
				IVM-Pat13-i-53-D	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
				IVM-Pat13-i-53-E	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
				IVM-Pat14-i-56-F	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
				IVM-Pat14-i-57-B	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
CpG-Fehler	in vivo-Pat5-i-11-E	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	in vivo-Pat3-m-32-E	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat5-i-13-C	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat9-m-60-E	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
	in vivo-Pat7-i-20-A	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	in vivo-Pat3-m-36-F	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	IVM-Pat7-i-19-B	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat16-m-64-B	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
					IVM-Pat7-i-23-D	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	IVM-Pat19-m-70-E	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
					IVM-Pat7-i-24-A	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
					IVM-Pat8-i-28-F	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>		
Abnorme Methylierung	in vivo-Pat7-i-17-A	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>			IVM-Pat8-i-29-E	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
				IVM-Pat10-i-39-C	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>			
				IVM-Pat10-i-41-F	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
				IVM-Pat11-i-47-E	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			

Abbildung 3-9: Lollipopdiagramme für *hOCT4*.

Auch hier wurde in der *In-vivo*-Gruppe ein abnorm methyliertes Allel gefunden, nicht jedoch in der IVM-Gruppe. CpG-Fehler traten in beiden Gruppen auf.

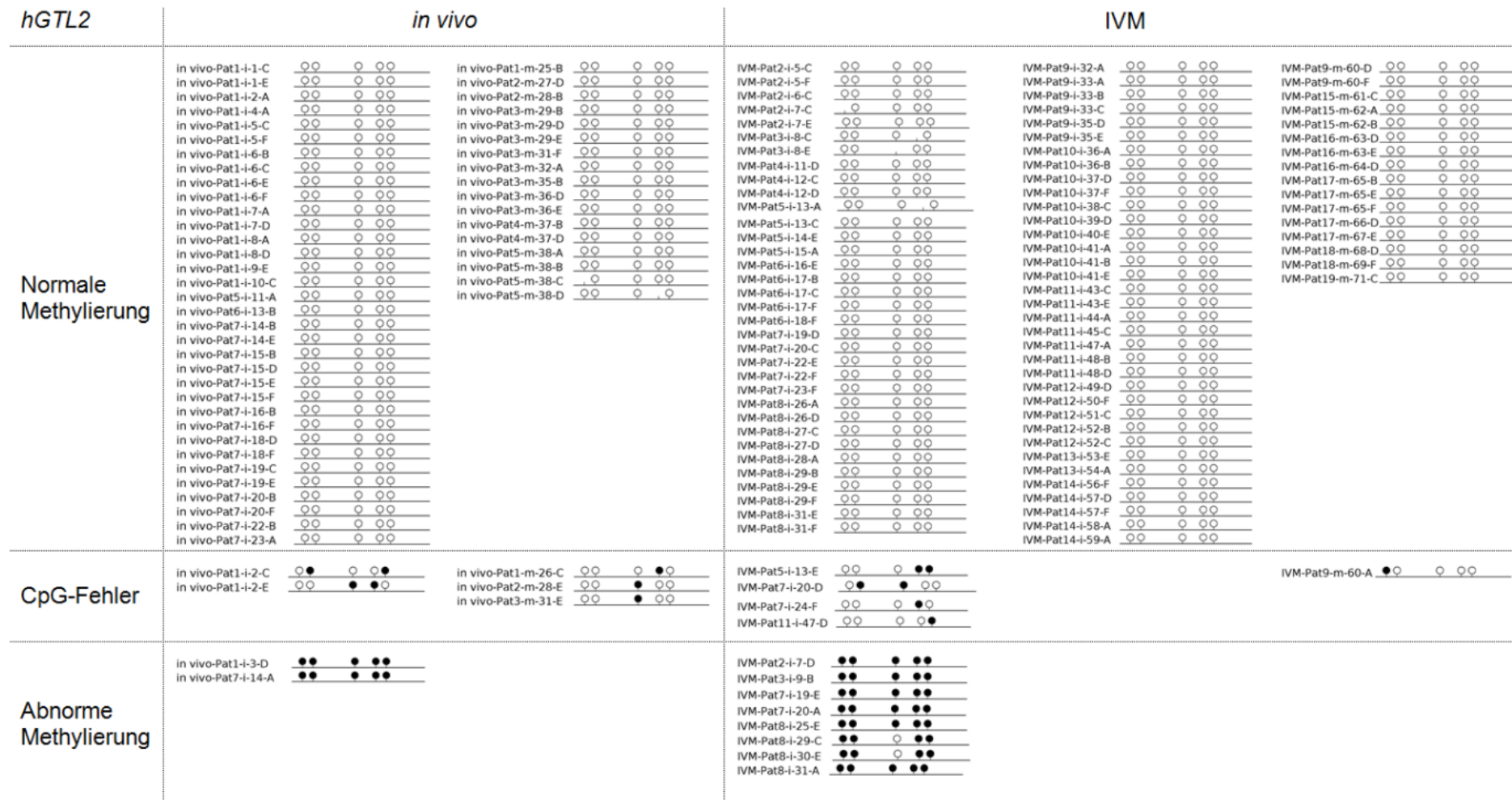


Abbildung 3-10: Lollipopdiagramme für hGTL2.

Es wurden sowohl für IVM- als auch für *In-vivo*-Oocyten abnorm methylierte Allele sowie CpG-Fehler-Allele identifiziert.

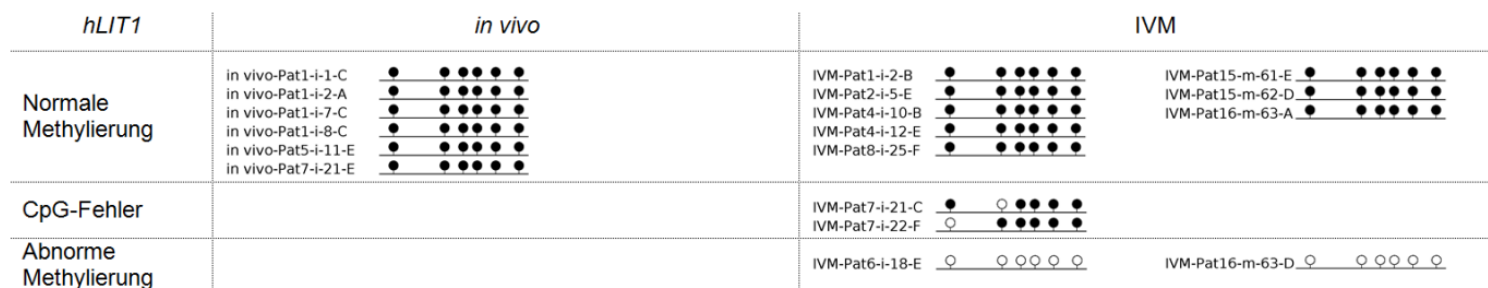


Abbildung 3-11: Lollipopdiagramme für *hLIT1*.

Nur in der IVM-Gruppe wurden 2 abnorm methylierte Allele sowie 2 CpG-Fehler-Allele detektiert.



Abbildung 3-12: Lollipopdiagramme für *hPEG3*.

Hier konnten in beiden Gruppen abnorm methylierte sowie CpG-Fehler-Allele identifiziert werden.

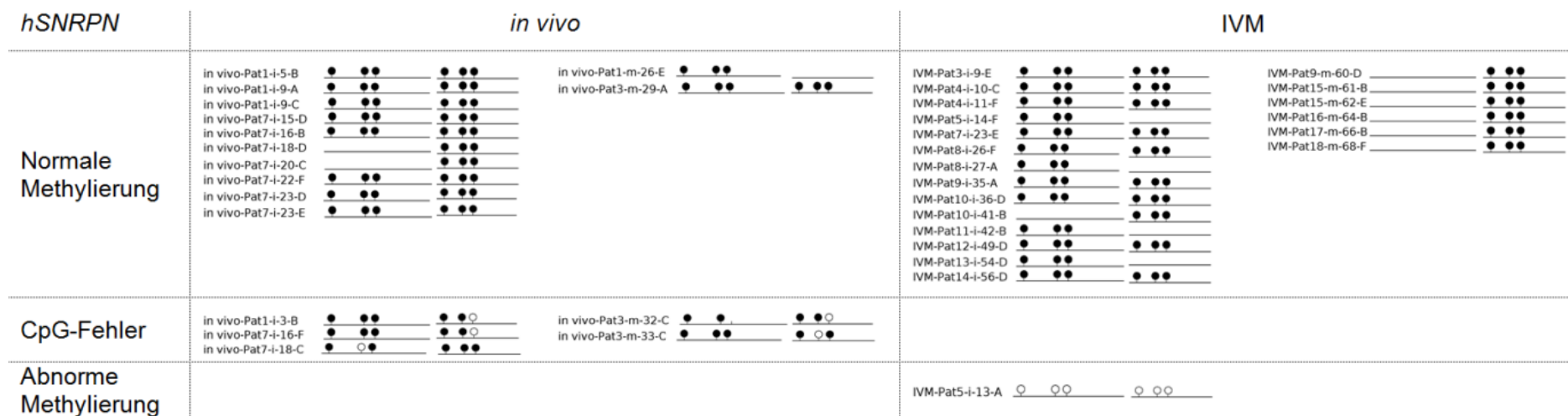


Abbildung 3-13: Lollipopdiagramme für *hSNRPN*.

Nur in der IVM-Gruppe wurde ein abnorm methyliertes Allel gefunden. CpG-Fehler-Allele wurden hingegen nur in der *In-vivo*-Gruppe identifiziert.

Da beide Gruppen unterschiedlich viele unreife (GV, MI-Stadium) und reife (MII-Stadium) Oocyten enthielten, wurde die Auswertung erweitert und dabei auch die Untergruppen unreifer bzw. reifer Oocyten verglichen, um zu überprüfen, ob sich hier eventuell ein Unterschied zwischen IVM und *In-vivo*-Oocyten findet. Des Weiteren wurden die normalen Allele zusätzlich unterschieden in vollständig normal methylierte Allele und solche Allele mit CpG-Fehler. Zunächst wurden dabei die Ergebnisse aller nicht geprägten Gene, aller geprägten Gene und aller insgesamt analysierten Gene zusammengefasst. Verglichen wurden einmal die Anzahl der Allele sowie die Anzahl der Oocyten (siehe Tabelle 3-13). Es konnte auch hier kein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden (siehe Tabelle 3-14).

Tabelle 3-13: Zusammenfassung der Ergebnisse nicht geprägter Gene, geprägter Gene und aller analysierten Gene insgesamt.

Angegeben sind die Anzahl der Allele mit normaler Methylierung, CpG-Fehlern oder abnormer Methylierung als auch die Anzahl der Oocyten mit entsprechender Methylierung.

Gruppe	Kategorie	Methylierung	Nicht geprägte Gene		Geprägte Gene		Alle analysierten Gene	
			Allele	Oocyten	Allele	Oocyten	Allele	Oocyten
IVM	Unreif	Normal	127	30	108	38	235	29
		CpG-Fehler	26 (16,99%)	21 (41,18%)	8 (6,25%)	5 (9,26%)	34 (12,10%)	19 (32,20%)
		Abnorm	0	0	12 (9,38%)	11 (20,37%)	12 (4,27%)	11 (18,64%)
	Reif	Normal	30	8	35	9	65	7
		CpG-Fehler	5 (14,29%)	4 (33,33%)	2 (5,13%)	2 (16,67%)	7 (9,46%)	4 (33,33%)
		Abnorm	0	0	2 (5,13%)	1 (8,33%)	2 (2,70%)	1 (8,33%)
	Gesamt	Normal	157	38	143	47	300	36
		CpG-Fehler	31 (16,49%)	25 (39,68%)	10 (5,99%)	7 (10,61%)	41 (11,55%)	23 (32,39%)
		Abnorm	0	0	14 (8,38%)	12 (18,18%)	14 (3,94%)	12 (16,90%)
<i>in vivo</i>	Unreif	Normal	62	15	69	16	131	12
		CpG-Fehler	10 (13,70%)	7 (30,43%)	6 (7,69%)	3 (13,64%)	16 (10,60%)	7 (30,43%)
		Abnorm	1 (1,37%)	1 (4,35%)	3 (3,85%)	3 (13,64%)	4 (2,65%)	4 (17,39%)
	Reif	Normal	34	10	27	8	61	7
		CpG-Fehler	4 (10,26%)	3 (21,43%)	5 (15,63%)	5 (38,46%)	9 (12,68%)	7 (46,67%)
		Abnorm	1 (2,56%)	1 (7,14%)	0	0	1 (1,41%)	1 (6,67%)
	Gesamt	Normal	96	25	96	24	192	19
		CpG-Fehler	14 (12,50%)	10 (27,03%)	11 (10,00%)	8 (22,86%)	25 (11,26%)	14 (36,84%)
		Abnorm	2 (1,79%)	2 (5,41%)	3 (2,73%)	3 (8,57%)	5 (2,25%)	5 (13,16%)

Tabelle 3-14: Vergleich der IVM und *In-vivo*-Oocyten hinsichtlich Abnormalität und Häufigkeit von CpG-Fehlern für nicht geprägte Gene, geprägte Gene und alle analysierten Gene insgesamt.

Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Fisher's Exact Test berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant.

Vergleich	Kategorie	Gene	IVM : <i>in vivo</i> Allele	IVM : <i>in vivo</i> Oocyten
			p-Werte (Fisher's Exact Test)	p-Werte (Fisher's Exact Test)
Normal : abnormal	Unreif	Nicht geprägte Gene	0,3230	0,3108
		Geprägte Gene	0,1732	0,7453
		Alle analysierten Gene	0,5940	1,0000
	Reif	Nicht geprägte Gene	1,0000	1,0000
		Geprägte Gene	0,4978	0,4800
		Alle analysierten Gene	1,0000	1,0000
	Gesamt	Nicht geprägte Gene	0,1386	0,1345
		Geprägte Gene	0,0725	0,2490
		Alle analysierten Gene	1,0000	0,7834
Vollständig normal : CpG- Fehler	Unreif	Nicht geprägte Gene	0,6971	0,6010
		Geprägte Gene	0,7827	0,6917
		Alle analysierten Gene	0,6395	1,0000
	Reif	Nicht geprägte Gene	0,7293	0,6728
		Geprägte Gene	0,2370	0,3864
		Alle analysierten Gene	0,6041	0,6887
	Gesamt	Nicht geprägte Gene	0,4076	0,3791
		Geprägte Gene	0,3555	0,2388
		Alle analysierten Gene	0,8938	0,8258

Als Nächstes wurde jedes Gen einzeln überprüft. Wieder wurden sowohl die Anzahl der Allele wie auch die Anzahl der Oocyten (siehe Tabelle 3-15 und Tabelle 3-16) verglichen. Es konnte kein statistischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden (siehe Tabelle 3-17). Einzig für *hSNRPN* treten in der *In-vivo*-Gruppe mehr CpG-Fehler auf, sowohl in der Anzahl der Allele wie auch in der Anzahl der betroffenen Oocyten. Bei der Berechnung der CpG-Fehler-Rate, bei der die Gesamtzahl der insgesamt analysierten normal methylierten CpGs mit der Gesamtanzahl der fehlerhaft methylierten CpGs verglichen wird, unter Ausschluss der abnormen Allele, konnte für *hSNRPN* jedoch keine signifikante Erhöhung der CpG-Fehler für *In-vivo*-Oocyten bestätigt werden (siehe Tabelle 3-18).

Tabelle 3-15: Tabellarische Übersicht der Methylierung nicht geprägter Gene in IVM und *In-vivo*-Oocyten.

Einzelergbnisse der Allele bzw. Oocyten unterteilt in unreife und reife Oocyten. Es wurde unterschieden zwischen vollständig normal methylierten Allelen (normal) und Allelen mit CpG-Fehlern.

Gruppe	Kategorie	Methylierung	<i>hDNMT3Lo</i>		<i>hNANOG</i>		<i>hOCT4</i>	
			Allele	Oocyten	Allele	Oocyten	Allele	Oocyten
IVM	Unreif	Normal	60	36	42	29	25	19
		CpG-Fehler	5 (7,69%)	5 (12,20%)	12 (22,22%)	11 (27,50%)	9 (26,47%)	9 (32,14%)
		Abnorm	0	0	0	0	0	0
	Reif	Normal	16	10	10	7	4	4
		CpG-Fehler	0	0	2 (16,67%)	1 (12,50%)	3 (42,86%)	3 (42,86%)
		Abnorm	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	Normal	76	46	52	36	29	23
		CpG-Fehler	5 (6,17%)	5 (9,80%)	14 (21,21%)	12 (25,00%)	12 (29,27%)	12 (34,29%)
		Abnorm	0	0	0	0	0	0
<i>in vivo</i>	Unreif	Normal	25	17	24	14	13	9
		CpG-Fehler	1 (3,85%)	1 (5,56%)	7 (22,58%)	5 (26,32%)	2 (12,50%)	2 (16,67%)
		Abnorm	0	0	0	0	1 (6,25%)	1 (8,33%)
	Reif	Normal	14	10	14	6	6	6
		CpG-Fehler	0	0	2 (11,76%)	2 (22,22%)	2 (25,00%)	2 (25,00%)
		Abnorm	0	0	1 (5,88%)	1 (11,11%)	0	0
	Gesamt	Normal	39	27	38	20	19	15
		CpG-Fehler	1 (2,50%)	1 (3,57%)	9 (18,75%)	7 (25,00%)	4 (16,67%)	4 (20,00%)
		Abnorm	0	0	1 (2,08)	1 (3,57%)	1 (4,17%)	1 (5,00%)

Tabelle 3-16: Tabellarische Übersicht der Methylierung geprägter Gene in IVM und *In-vivo*-Oocyten.

Angegeben sind die Einzelergebnisse der Allele bzw. Oocyten mit Unterteilung in unreife und reife Oocyten. Es wurde unterschieden zwischen vollständig normal methylierten Allelen (normal) und Allelen mit CpG-Fehlern.

Gruppe	Kategorie	Methylierung	<i>hGTL2</i>		<i>hLIT1</i>		<i>hPEG3</i>		<i>hSNRPN</i>	
			Allele	Oocyten	Allele	Oocyten	Allele	Oocyten	Allele	Oocyten
IVM	Unreif	Normal	69	38	5	5	20	17	14	14
		CpG-Fehler	4 (4,94%)	3 (6,12%)	2 (25,00%)	2 (25,00%)	2 (8,33%)	2 (9,52%)	0	0
		Abnorm	8 (9,88%)	8 (16,33%)	1 (12,5%)	1 (12,50%)	2 (8,33%)	2 (9,52%)	1 (6,67%)	1 (6,67%)
	Reif	Normal	16	10	3	2	10	7	6	6
		CpG-Fehler	1 (5,88%)	1 (9,09%)	0	0	1 (8,33%)	1 (11,11%)	0	0
		Abnorm	0	0	1 (25,00%)	1 (33,33%)	1 (8,33%)	1 (11,11%)	0	0
	Gesamt	Normal	85	48	8	7	30	24	20	20
		CpG-Fehler	5 (5,10%)	4 (6,67%)	2 (16,67%)	2 (18,18%)	3 (8,33%)	3 (10,00%)	0	0
		Abnorm	8 (8,16%)	8 (13,33%)	2 (16,67%)	2 (9,09%)	3 (8,33%)	3 (10,00%)	1 (4,76%)	1 (4,76%)
<i>in vivo</i>	Unreif	Normal	34	17	6	6	19	10	10	6
		CpG-Fehler	2 (5,26%)	1 (5,00%)	0	0	1 (4,76%)	1 (8,33%)	3 (23,08%)	3 (33,33%)
		Abnorm	2 (5,26%)	2 (10,00%)	0	0	1 (4,76%)	1 (8,33%)	0	0
	Reif	Normal	17	8	0	0	8	8	2	2
		CpG-Fehler	3 (15,00%)	3 (27,27%)	0	0	0	0	2 (50,00%)	2 (50,00%)
		Abnorm	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	Normal	51	25	6	6	27	18	12	8
		CpG-Fehler	5 (8,62%)	4 (12,90%)	0	0	1 (3,45%)	1 (5,00%)	5 (29,41%)	5 (38,46%)
		Abnorm	2 (3,45%)	2 (6,45%)	0	0	1 (3,45%)	1 (5,00%)	0	0

Tabelle 3-17: Vergleich IVM und *In-vivo*-Oocyten für Einzelgene im Hinblick auf Abnormalität und CpG-Fehler.

Die p-Werte wurden mit Fisher's Exact Test berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant.

Vergleich	Kategorie	Gene	IVM : <i>in vivo</i> Allele	IVM : <i>in vivo</i> Oocyten
			p-Werte (Fisher's Exact Test)	p-Werte (Fisher's Exact Test)
Normal : abnormal	Unreif	<i>hOCT4</i>	0,3200	0,3000
		<i>hGTL2</i>	0,4991	0,7120
		<i>hLIT1</i>	1,0000	1,0000
		<i>hPEG3</i>	1,0000	1,0000
		<i>hSNRPN</i>	1,0000	1,0000
	Reif	<i>hNANOG</i>	1,0000	1,0000
		<i>hPEG3</i>	1,0000	1,0000
	Gesamt	<i>hNANOG</i>	0,4211	0,3684
		<i>hOCT4</i>	0,3692	0,3636
		<i>hGTL2</i>	0,3239	0,4848
		<i>hLIT1</i>	0,5294	0,5147
		<i>hPEG3</i>	0,6222	0,6411
		<i>hSNRPN</i>	1,0000	1,0000
	Vollständig normal : CpG- Fehler	Unreif	<i>hDNMT3Lo</i>	0,6699
<i>hNANOG</i>			1,0000	1,0000
<i>hOCT4</i>			0,4644	0,4609
<i>hGTL2</i>			1,0000	1,0000
<i>hLIT1</i>			0,4615	0,4615
<i>hPEG3</i>			1,0000	1,0000
<i>hSNRPN</i>			0,0978	0,0474
Reif		<i>hNANOG</i>	1,0000	1,0000
		<i>hOCT4</i>	0,6084	0,6084
		<i>hGTL2</i>	0,6088	0,5865
		<i>hPEG3</i>	1,0000	1,0000
		<i>hSNRPN</i>	0,1333	0,1333
Gesamt		<i>hDNMT3Lo</i>	0,6623	0,4147
		<i>hNANOG</i>	0,8177	1,0000
		<i>hOCT4</i>	0,3749	0,3652
		<i>hGTL2</i>	0,5075	0,4478
		<i>hLIT1</i>	0,5000	0,4857
	<i>hPEG3</i>	0,6175	0,6322	
	<i>hSNRPN</i>	0,0142	0,0054	

Tabelle 3-18: CpG-Fehler-Raten im Vergleich IVM gegen *In-vivo*-Oocyten.

Für die Berechnung der CpG-Fehler-Rate wurden abnorm methylierte Allele ausgeschlossen. Die Fehlerrate berechnet sich aus dem Verhältnis der Anzahl normal methylierter CpGs normaler Allele zu fehlerhaft methylierten CpGs normaler Allele. Die p-Werte wurden mit Fisher's Exact Test berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant.

Gene	Kategorie	p-Wert (Fisher's Exact Test)	IVM			<i>in vivo</i>		
			CpGs gesamt	CpGs normal	CpG- Fehler	CpGs gesamt	CpGs normal	CpG- Fehler
hDNMT3Lo	Unreif	1,0000	259	254	5 (1,93%)	103	102	1 (0,97%)
	Reif	-	64	64	0	56	56	0
	Gesamt	0,6688	323	318	5 (1,55%)	159	158	1 (0,63%)
hNANOG	Unreif	0,4886	265	253	12 (4,53%)	146	137	9 (6,16%)
	Reif	0,6526	60	57	3 (5,00%)	78	76	2 (2,56%)
	Gesamt	1,0000	325	310	15 (4,62%)	224	213	11 (4,91%)
hOCT4	Unreif	0,4950	68	59	9 (13,24%)	30	28	2 (6,67%)
	Reif	0,6322	13	10	3 (23,08%)	16	14	2 (12,50%)
	Gesamt	0,4101	81	69	12 (14,81%)	46	42	4 (8,70%)
hGTL2	Unreif	0,7374	361	355	6 (1,66%)	180	176	4 (2,22%)
	Reif	0,6247	85	84	1 (1,18%)	98	95	3 (3,06%)
	Gesamt	0,4114	446	439	7 (1,57%)	278	271	7 (2,52%)
hLIT1	Unreif	0,4965	42	40	2 (4,76%)	36	36	0
	Reif	-	18	18	0	0	0	0
	Gesamt	0,5263	60	58	2 (3,33%)	36	36	0
hPEG3	Unreif	1,0000	66	64	2 (3,03%)	60	59	1 (1,67%)
	Reif	1,0000	33	32	1 (3,03%)	24	24	0
	Gesamt	0,6260	99	96	3 (3,03%)	84	83	1 (1,19%)
hSNRPN	Unreif	0,2450	69	69	0	72	69	3 (4,17%)
	Reif	0,4879	18	18	0	20	18	2 (10,00%)
	Gesamt	0,0595	87	87	0	92	87	5 (5,43%)

Gene	Kategorie	p-Wert (Fisher's Exact Test)	IVM			<i>in vivo</i>		
			CpGs gesamt	CpGs normal	CpG- Fehler	CpGs gesamt	CpGs normal	CpG- Fehler
Nicht geprägte Gene	Unreif	1,0000	592	566	26 (4,39%)	279	267	12 (4,30%)
	Reif	0,5270	137	131	6 (4,38%)	150	146	4 (2,67%)
	Gesamt	0,6489	729	697	32 (4,39%)	429	413	16 (3,73%)
Geprägte Gene	Unreif	0,6356	538	528	10 (1,86%)	348	340	8 (2,30%)
	Reif	0,2663	154	152	2 (1,30%)	142	137	5 (1,30%)
	Gesamt	0,3086	692	680	12 (1,73%)	490	477	13 (2,65%)
Alle analysier- ten Gene	Unreif	1,0000	1130	1094	36 (3,19%)	627	607	20 (3,19%)
	Reif	1,0000	291	283	8 (2,75%)	292	283	9 (3,08%)
	Gesamt	1,0000	1421	1377	44 (3,10%)	919	890	29 (3,16%)

Da sowohl in den IVM- als auch in den *In-vivo*-Oocyten die unreifen Oocyten mehr abnorme Methylierungsmuster aufwiesen als die reifen, wurde verglichen ob sich diese Beobachtung statistisch bestätigen würde. Dabei wurden wieder sowohl die Anzahl erhaltener abnormer Allele (siehe Tabelle 3-19) als auch die Anzahl an Oocyten mit abnormen Allelen (Werte hier nicht angegeben) verglichen. Zunächst wurde in jeder Gruppe einzeln überprüft, ob es einen Unterschied zwischen reifen und unreifen Oocyten gibt. Zusätzlich wurde ein Vergleich durchgeführt, bei dem alle unreifen IVM- und *In-vivo*-Oocyten zusammengefasst wurden und gegen alle reifen Oocyten der IVM- und *In-vivo*-Gruppe verglichen wurden. Die Beobachtung, dass in unreifen Oocyten mehr abnorme Allele auftreten, konnte jedoch statistisch nicht bestätigt werden, weder für den Vergleich der Allelanzahl noch für den Vergleich der Anzahl an Oocyten mit abnormen Allelen.

Auch ein Vergleich der CpG-Fehler-Raten in unreifen und reifen Oocyten zeigte keinen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 3-21). Ebenso konnte beim Vergleich der Anzahl der Allele (siehe Tabelle 3-20) bzw. Oocyten mit CpG-Fehler-Allelen (Werte nicht angegeben) kein Unterschied zwischen reifen und unreifen Oocyten gefunden werden.

Tabelle 3-19: Vergleich unreifer und reifer Oocyten hinsichtlich der Häufigkeit abnormer Allele.

Verglichen wurde die Allelanzahl normaler oder abnormer Methylierung innerhalb der IVM-Gruppe, innerhalb der *In-vivo*-Gruppe und aller Allele unreifer Oocyten sowohl der IVM- als auch der *In-vivo*-Gruppen vereint gegen alle Allele reifer Oocyten beider Gruppen. Normale Allele waren hier all solche mit vollständig normaler Methylierung als auch solche mit CpG-Fehlern. Die p-Werte wurden mit Fisher's Exact Test berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant. Sofern keine abnorm methylierten Allele vorlagen, wurde kein p-Wert berechnet (-).

Gene	Methylierung	IVM		<i>in vivo</i>		IVM + <i>in vivo</i>	
		Unreif	Reif	Unreif	Reif	Unreif	Reif
<i>hDNMT3Lo</i>	Normale Allele	65	16	26	14	91	30
	Abnorme Allele	0	0	0	0	0	0
	p-Wert	-		-		-	
<i>hNANOG</i>	Normale Allele	54	12	31	16	85	28
	Abnorme Allele	0	0	0	1	0	1
	p-Wert	-		0,3542		0,2544	
<i>hOCT4</i>	Normale Allele	34	7	15	8	49	15
	Abnorme Allele	0	0	1	0	1	0
	p-Wert	-		1,0000		1,0000	
<i>hGTL2</i>	Normale Allele	73	7	36	20	109	37
	Abnorme Allele	8	0	2	0	10	0
	p-Wert	0,3439		0,5402		0,1185	
<i>hLIT1</i>	Normale Allele	7	3	6	0	13	3
	Abnorme Allele	1	1	0	0	1	1
	p-Wert	1,0000		-		0,4052	
<i>hPEG3</i>	Normale Allele	22	11	20	8	42	19
	Abnorme Allele	2	1	1	0	3	1
	p-Wert	1,0000		1,0000		1,0000	
<i>hSNRPN</i>	Normale Allele	14	6	13	4	27	10
	Abnorme Allele	1	0	0	0	1	0
	p-Wert	1,0000		-		1,0000	
Nicht geprägt	Normale Allele	153	35	72	38	225	73
	Abnorme Allele	0	0	1	1	1	1
	p-Wert	-		1,0000		0,4331	
Geprägt	Normale Allele	116	37	75	32	191	69
	Abnorme Allele	12	2	3	0	15	2
	p-Wert	0,5243		0,5547		0,2538	
Alle Gene	Normale Allele	269	72	147	70	416	142
	Abnorme Allele	12	2	4	1	16	3
	p-Wert	0,7428		1,0000		0,4294	

Tabelle 3-20: Vergleich unreifer und reifer Oocyten hinsichtlich der Häufigkeit von CpG-Fehler-Allelen.

Die Anzahl vollständig normal methylierter Allele wurde mit der Anzahl an CpG-Fehler-Allelen verglichen innerhalb der IVM-Gruppe, innerhalb der *In-vivo*-Gruppe und im letzten Vergleich wurden alle Allele unreifer Oocyten beider Gruppen verglichen mit den Allelen aller reifen Oocyten beider Gruppen. Die p-Werte wurden wieder mit Fisher's Exact Test berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant. Wenn keine CpG-Fehler vorlagen wurde kein p-Wert berechnet (-).

Gene	Methylierung	IVM		<i>in vivo</i>		IVM + <i>in vivo</i>	
		Unreif	Reif	Unreif	Reif	Unreif	Reif
<i>hDNMT3Lo</i>	Normale Allele	60	16	25	14	85	30
	CpG-Fehler	5	0	1	0	6	0
	p-Wert	0,5772		1,0000		0,3345	
<i>hNANOG</i>	Normale Allele	42	10	24	14	66	24
	CpG-Fehler	12	2	7	2	19	4
	p-Wert	1,0000		0,6974		0,4284	
<i>hOCT4</i>	Normale Allele	25	4	13	6	38	10
	CpG-Fehler	9	3	2	2	11	5
	p-Wert	0,3978		0,5889		0,4976	
<i>hGTL2</i>	Normale Allele	69	16	34	17	103	33
	CpG-Fehler	4	1	2	3	6	4
	p-Wert	1,0000		0,3364		0,2742	
<i>hLIT1</i>	Normale Allele	5	3	6	0	11	3
	CpG-Fehler	2	0	0	0	2	0
	p-Wert	1,0000		-		1,0000	
<i>hPEG3</i>	Normale Allele	20	10	19	8	39	18
	CpG-Fehler	2	1	1	0	3	1
	p-Wert	1,0000		1,0000		1,0000	
<i>hSNRPN</i>	Normale Allele	14	6	10	2	24	8
	CpG-Fehler	0	0	3	2	3	2
	p-Wert	-		0,5378		0,5974	
Nicht geprägt	Normale Allele	127	30	62	34	189	64
	CpG-Fehler	26	5	10	4	36	9
	p-Wert	0,8052		0,7675		0,5730	
Geprägt	Normale Allele	108	35	69	27	177	62
	CpG-Fehler	8	2	6	5	14	7
	p-Wert	1,0000		0,2985		0,4485	
Alle Gene	Normale Allele	235	65	131	61	366	126
	CpG-Fehler	34	7	16	9	50	16
	p-Wert	0,6831		0,6558		0,8812	

Tabelle 3-21: CpG-Fehler-Raten-Vergleich unreifer gegen reife Oocyten.

Die CpG-Fehler-Raten wurden zwischen unreifen und reifen Oocyten verglichen innerhalb der IVM-Gruppe, innerhalb der *In-vivo*-Gruppe und einmal zusammengefasst, d. h. alle unreifen IVM- und *In-vivo*-Oocyten gegen alle reifen IVM- und *In-vivo*-Oocyten. Die p-Werte wurden mit Fisher's Exact Test ermittelt. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant.

Gene	Methylierung	IVM		<i>in vivo</i>		IVM + <i>in vivo</i>	
		Unreif	Reif	Unreif	Reif	Unreif	Reif
<i>hDNMT3Lo</i>	Normale CpGs	254	64	102	56	356	120
	CpG-Fehler	5	0	1	0	6	0
	p-Wert	0,5872		1,0000		0,3442	
<i>hNANOG</i>	Normale CpGs	253	57	137	76	390	133
	CpG-Fehler	12	3	9	2	21	5
	p-Wert	0,7449		0,3369		0,6440	
<i>hOCT4</i>	Normale CpGs	59	10	28	14	87	24
	CpG-Fehler	9	3	2	2	11	5
	p-Wert	0,3975		0,6019		0,5234	
<i>hGTL2</i>	Normale CpGs	355	84	176	95	531	179
	CpG-Fehler	6	1	4	3	10	4
	p-Wert	1,0000		0,7001		0,7598	
<i>hLIT1</i>	Normale CpGs	40	18	36	0	76	18
	CpG-Fehler	2	0	0	0	2	0
	p-Wert	1,0000		-		1,0000	
<i>hPEG3</i>	Normale CpGs	64	32	59	24	123	56
	CpG-Fehler	2	1	1	0	3	1
	p-Wert	1,0000		1,0000		1,0000	
<i>hSNRPN</i>	Normale CpGs	69	18	69	18	138	36
	CpG-Fehler	0	0	3	2	3	2
	p-Wert	-		0,2971		0,2872	
Nicht geprägt	Normale CpGs	566	131	267	146	833	277
	CpG-Fehler	26	6	12	4	38	10
	p-Wert	1,0000		0,5940		0,6103	
Geprägt	Normale CpGs	528	152	340	137	868	289
	CpG-Fehler	10	2	8	5	18	7
	p-Wert	1,0000		0,5358		0,8154	
Alle Gene	Normale CpGs	1094	283	607	283	1701	566
	CpG-Fehler	36	8	20	9	56	17
	p-Wert	0,8500		1,0000		0,8906	

Die hier gefundenen abnorm methylierten Allele wurden für beide Gruppen in jeweils verschiedenen Oocyten von verschiedenen Patienten gefunden. Lediglich in der IVM-Gruppe wurde für Patientin Nummer 16 eine einzige Oocyte gefunden, die für zwei Gene Imprint-Fehler zeigte (*hLIT1*, *hPEG3*). Die gefundenen abnorm methylierten Allele verteilten sich gleichmäßig auf die verschiedenen Patientinnen (siehe Tabelle 3-22).

Tabelle 3-22: Verteilung der abnorm methylierten Allele auf die verschiedenen untersuchten Patienten.

	Patientennummer	Gen(e) mit abnormer Methylierung	Anzahl betroffener Allele
<i>in vivo</i>	1	<i>hNANOG</i> <i>hGTL2</i>	Je 1
	5	<i>hPEG3</i>	1
	7	<i>hOCT4</i> <i>hGTL2</i>	Je 1
IVM	2	<i>hGTL2</i>	1
	3	<i>hGTL2</i>	1
	5	<i>hSNRPN</i>	1
	6	<i>hLIT1</i>	1
	7	<i>hGTL2</i> <i>hPEG3</i>	Je 2
	8	<i>hGTL2</i>	4
	16	<i>hLIT1</i> <i>hPEG3</i>	Je 1; beide in derselben Oocyte

Da bei den mittels LD-Methodik untersuchten Spermienproben festgestellt worden war, dass *hGTL2* deutlich mehr CpG-Fehler aufwies als die anderen untersuchten Gene, wurde auch für die hier untersuchten Oocyten überprüft, ob gegebenenfalls ebenso ein Unterschied zwischen den Genen zu beobachten wäre. Dazu wurden die verschiedenen hier untersuchten Gene hinsichtlich ihrer Anzahl normal oder fehlerhaft methylierter CpGs gegeneinander verglichen. Abnorm methylierte Allele wurden wieder von der Analyse ausgeschlossen. Die CpG-Fehler-Raten sind bereits in Tabelle 3-18 angegeben. Hierbei zeigte sich, dass vor allem *hOCT4* deutlich mehr CpG-Fehler aufwies als andere Gene (siehe Tabelle 3-23). Der erhöhte Anteil von CpG-Fehlern wurde vor allem in IVM-Oocyten beobachtet, aber im Vergleich von *hOCT4* gegen *hDNMT3Lo* konnte auch in *In-vivo*-Oocyten ein Unterschied beobachtet werden. Auch *hNANOG* zeigte teils mehr CpG-Fehler als die anderen Gene. Diese traten wieder hauptsächlich in IVM-Oocyten auf, allerdings konnte hier ebenso in *In-vivo*-Oocyten im Vergleich zu *hDNMT3Lo* ein Unterschied gefunden werden. Für *hSNRPN* wurde ebenfalls in der *In-vivo*-Gruppe beobachtet, dass *hSNRPN* mehr CpG-Fehler als *hDNMT3Lo* zeigte. Für alle anderen Gene wurden keine Unterschiede in der Häufigkeit von CpG-Fehlern gefunden.

Tabelle 3-23: Vergleich der verschiedenen untersuchten Gene untereinander hinsichtlich der Häufigkeit von CpG-Fehlern.

Die p-Werte wurden mit Fisher's Exact Test berechnet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ gilt als signifikant. Gab es keine CpG-Fehler, wurde kein p-Wert berechnet (-).

Gen	Kategorie		<i>hLIT1</i>	<i>hPEG3</i>	<i>hSNRPN</i>	<i>hDNMT3Lo</i>	<i>hNANOG</i>	<i>hOCT4</i>
<i>hGTL2</i>	<i>in vivo</i>	Gesamt	1,0000	0,6871	0,1818	0,2678	0,2264	0,0553
		Unreif	1,0000	1,0000	0,4112	0,6561	0,0894	0,2052
		Reif	-	1,0000	0,1989	0,5541	1,0000	0,1437
	IVM	Gesamt	0,2899	0,3988	0,6055	1,0000	0,0153	0,0001
		Unreif	0,1985	0,3576	0,5956	1,0000	0,0503	0,0001
		Reif	1,0000	0,4828	1,0000	1,0000	0,3069	0,0069
	IVM + <i>in vivo</i>	Gesamt	1,0000	0,7702	0,5583	0,4910	0,0055	0,0001
		Unreif	0,6546	0,7197	0,7376	1,0000	0,0056	0,0001
		Reif	1,0000	1,0000	0,2752	0,1552	0,5060	0,0029
<i>hLIT1</i>	<i>in vivo</i>	Gesamt		1,0000	0,3208	1,0000	0,3709	0,1270
		Unreif		1,0000	0,5493	1,0000	0,2084	0,2028
		Reif		-	-	-	-	-
	IVM	Gesamt		1,0000	0,1649	0,3018	0,3113	0,0254
		Unreif		0,6414	0,1410	0,2535	1,0000	0,1998
		Reif		1,0000	-	-	1,0000	0,0636
	IVM + <i>in vivo</i>	Gesamt		1,0000	1,0000	0,6256	0,4115	0,0050
		Unreif		1,0000	1,0000	0,6361	0,5573	0,0402
		Reif		1,0000	1,0000	-	1,0000	0,1409
<i>hPEG3</i>	<i>in vivo</i>	Gesamt			0,3208	1,0000	0,1908	0,0527
		Unreif			0,6256	1,0000	0,2868	0,2567
		Reif			0,2008	-	1,0000	0,1538
	IVM	Gesamt			0,2491	0,3979	0,4035	0,0058
		Unreif			0,2371	0,6334	0,7444	0,0550
		Reif			1,0000	0,3402	1,0000	0,0622
	IVM + <i>in vivo</i>	Gesamt			0,7485	0,4745	0,1943	0,0003
		Unreif			1,0000	0,7010	0,2283	0,0102
		Reif			0,5618	0,3220	0,6733	0,0154
<i>hSNRPN</i>	<i>in vivo</i>	Gesamt				0,0261	0,7852	0,4809
		Unreif				0,3071	0,7548	0,6295
		Reif				0,0667	0,1839	1,0000
	IVM	Gesamt				0,5889	0,5897	0,0001
		Unreif				0,5881	0,1369	0,0014
		Reif				-	1,0000	0,0636
	IVM + <i>in vivo</i>	Gesamt				0,1790	0,3927	0,0011
		Unreif				0,7153	0,1570	0,0044
		Reif				0,0567	0,6450	0,2251
<i>hDNMT3Lo</i>	<i>in vivo</i>	Gesamt					0,0175	0,0095
		Unreif					0,0497	0,1275
		Reif					0,5098	0,0469
	IVM	Gesamt					1,0000	0,0001
		Unreif					0,1374	0,0004
		Reif					0,1103	0,0039
	IVM + <i>in vivo</i>	Gesamt					0,0011	0,0001
		Unreif					0,0100	0,0001
		Reif					0,0631	0,0002
<i>hNANOG</i>	<i>in vivo</i>	Gesamt						0,2959
		Unreif						1,0000
		Reif						0,1331
	IVM	Gesamt						0,0001
		Unreif						0,0205
		Reif						0,0654
	IVM + <i>in vivo</i>	Gesamt						0,0033
		Unreif						0,0353
		Reif						0,0152

Zusammenfassend konnte hinsichtlich der Häufigkeit von Epimutationen kein Unterschied zwischen IVM- und *In-vivo*-gereiften Oocyten festgestellt werden. In unreifen Oocyten wurden mehr Epimutationen und CpG-Fehler detektiert, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zu reifen Oocyten festgestellt werden.

3.2 Untersuchungen zur Häufigkeit von Epimutationen in humanen Spermien unterschiedlicher Qualität und zum potentiellen Einfluss dieser Epimutationen auf den ART-Erfolg

Mittels der LD-Technik kann aufgrund des Aufwandes nur eine geringe Anzahl an Proben untersucht werden. Abhilfe schafft da die neuere NGS-Methode Deep Bisulfite Sequencing. Da beim DBS jede Probe einen eigenen Barcode (MID) erhält, können in einem Sequenzierlauf mehrere Proben verschiedener Individuen sowie mehrere Gene gleichzeitig sequenziert werden, welche anschließend mittels des Amplifyerprogramms anhand der MID- und Amplikonsequenzen voneinander separiert werden. Außerdem ermöglicht DBS die Sequenzierung einer größeren Anzahl an CpGs, als es mit der herkömmlichen Pyrosequenzierung möglich ist. Durch die klonale Amplifizierung vor der Sequenzierung werden einzelne Allele vervielfältigt, wodurch mehrere Tausend Kopien einzelner Allele untersucht werden können und wodurch auch selten auftretende Epimutationen verlässlich detektiert werden.

Von den hier untersuchten 54 Spermienproben wiesen 27 ein normales Spermio-gramm auf und weitere 27 Proben stammten von OAT-Patienten. Jede dieser Gruppen war unterteilt in je eine Subgruppe aus 13 Proben, die zu einer Lebendgeburt geführt hatten, und eine Subgruppe aus jeweils 14 Proben, für die nach ART keine Schwangerschaft etabliert werden konnte. Von Interesse war bei dieser Untersuchung, ob sich ein epigenetischer Unterschied zeigen würde zwischen Spermien mit normalen oder abnormen (OAT) Spermienparametern, ebenso wie die Frage, ob sich der ART-Ausgang in den epigenetischen Mustern der hier untersuchten geprägten Gene und Pluripotenzgene widerspiegeln würde und ob demzufolge das paternale epigenetische Erbe Einfluss auf die Entwicklung des Embryo nehmen könnte.

Wie auch schon während der LD-Experimente beobachtet, konnten während der DBS-Experimente unterschiedliche Effizienzen in der Amplifizierung und Sequenzierung der verschiedenen Gene festgestellt werden. Wie bereits beobachtet, lieferten die geprägten Gene *hGTL2* und *hPEG3* die meisten Ergebnisse, während *hNANOG* im Mittelfeld lag und *hOCT4* am schwierigsten zu amplifizieren und sequenzieren war. Dies spiegelt sich in der Anzahl der erhaltenen Reads wider, die sich zwischen den verschiedenen Genen stark unterschieden (siehe Tabelle 3-24 und Tabelle 3-25).

Tabelle 3-24: Anzahl analysierbarer Reads der verschiedenen mittels DBS untersuchten Gene.

Gene	Mittelwert analysierter Reads	Reichweite erhaltener analysierbarer Reads
<i>hGTL2</i>	1164	101 – 4455
<i>hPEG3</i>	1473	297 – 6759
<i>hNANOG</i>	976	77 – 2697
<i>hOCT4</i>	581	50 – 1537

Tabelle 3-25: Übersicht der je Probe erhaltenen Reads.

NL = normales Spermogramm, Lebendgeburt; NK = normales Spermogramm, keine Schwangerschaft; OL = OAT-Syndrom, Lebendgeburt; OK = OAT-Syndrom, keine Schwangerschaft. Für *hOCT4* konnten für die Proben ON-4, ON-8, ON-10 und ON-14 keine Reads erhalten werden.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
GTL2	NL	1550	752	1458	1560	776	541	440	515	941	1314	508	2157	1465	-
	NK	2256	2076	731	613	2524	1304	2327	1338	762	538	1577	972	1464	789
	OL	2171	519	750	1503	604	1263	4455	963	2032	1246	513	920	1125	-
	OK	2351	1761	649	145	961	1031	1068	101	559	194	884	704	932	245
PEG3	NL	1353	835	1049	1628	760	753	646	830	1559	1269	633	638	3850	-
	NK	4673	3123	907	569	2049	1116	1972	1272	985	633	2476	1509	2029	1033
	OL	4095	612	893	1285	987	1212	806	511	793	1775	1103	1354	1856	-
	OK	4634	6759	937	406	1273	1066	1078	297	942	786	1300	1220	1110	305
NANOG	NL	683	584	1027	1217	493	1711	298	1219	970	1343	1168	1479	649	-
	NK	2187	2607	694	396	2109	911	1616	875	601	251	1389	684	1165	819
	OL	1681	599	705	761	734	1008	620	1023	1119	1027	1487	705	1542	-
	OK	2095	1404	775	135	886	1010	904	160	1278	77	724	321	606	144
OCT4	NL	522	272	578	1027	196	339	115	444	775	1139	272	464	50	-
	NK	686	189	310	236	1537	769	1086	633	534	325	774	509	777	541
	OL	883	186	133	742	309	638	696	215	231	1045	431	678	1161	-
	OK	1102	668	262	0	523	865	680	0	270	0	890	856	461	0

Um zu überprüfen wie zuverlässig mittels DBS Epimutationen detektiert werden können, wurde jeweils die erste Probe jeder Spermengruppe als Triplet untersucht, d.h. dass für die Proben NL-1, NK-1, OL-1 und OK-1 von der jeweiligen Ausgangs-DNA drei separate PCR-Ansätze (A-C) generiert und anschließend sequenziert wurden. Bei der Probenbezeichnung steht N jeweils für gute, also normale Spermienparameter und O für OAT-Syndrom, während der zweite Buchstabe den ART-Ausgang wiedergibt mit L für Proben, die zu einer Lebendgeburt führten, und K für solche Proben,

für die keine Schwangerschaft etabliert werden konnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-26 wiedergegeben. Allele wurden als abnorm methyliert definiert, wenn $\geq 50\%$ der analysierten CpGs ein dem Normalzustand entgegengesetztes Methylierungsmuster aufwiesen. Als normal methyliert galten sämtliche vollständig korrekt methylierte Allele sowie Allele mit einem einzigen CpG-Fehler pro Allel. Alle Allele, die mehr als nur einen CpG-Fehler aufwiesen, insgesamt jedoch für $> 50\%$ der analysierten CpGs normale Methylierung zeigten, wurden als intermediär methyliert definiert.

Tabelle 3-26: Ergebnisse des Triplet-Tests.

NL = normales Spermogramm, Lebendgeburt; NK = normales Spermogramm, keine Schwangerschaft; OL = OAT-Syndrom, Lebendgeburt; OK = OAT-Syndrom, keine Schwangerschaft. Für jede Spermengruppe wurde je eine Probe getestet, indem 3 verschiedene PCR-Ansätze (A-C) generiert wurden, denen unterschiedliche MIDs zugeordnet wurden. Angegeben sind die Readzahlen sowie in Klammern der Prozentanteil der Reads für die verschiedenen Methylierungszustände.

Gen	Gruppe	Triplet	Reads gesamt	Normal	Intermediär	Abnormal
<i>hGTL2</i>	NL-1	A	1214	1090 (89,79%)	122 (10,05%)	2 (0,16%)
		B	1164	1046 (89,86%)	115 (9,88%)	3 (0,26%)
		C	1550	1398 (90,19%)	146 (9,42%)	6 (0,39%)
	NK-1	A	1237	1155 (93,37%)	80 (6,47%)	2 (0,16%)
		B	729	697 (95,61%)	31 (4,25%)	1 (0,14%)
		C	2256	2118 (93,88%)	131 (5,81%)	7 (0,31%)
	OL-1	A	1166	1083 (92,88%)	78 (6,69%)	5 (0,43%)
		B	2171	2084 (95,99%)	85 (3,92%)	2 (0,09%)
		C	1200	1158 (96,50%)	39 (3,25%)	3 (0,25%)
	OK-1	A	1210	1036 (85,62%)	95 (7,85%)	79 (6,53%)
		B	2351	2030 (86,35%)	215 (9,15%)	106 (4,51%)
		C	2169	1802 (83,08%)	200 (9,22%)	167 (7,70%)
<i>hPEG3</i>	NL-1	A	1353	1338 (98,89%)	11 (0,81%)	4 (0,30%)
		B	503	490 (97,42%)	4 (0,80%)	9 (1,79%)
		C	1275	1265 (99,22%)	10 (0,78%)	0
	NK-1	A	2205	2134 (96,78%)	71 (3,22%)	0
		B	539	533 (98,88%)	3 (0,56%)	3 (0,56%)
		C	4673	4648 (99,47%)	24 (0,51%)	1 (0,02%)
	OL-1	A	1260	1249 (99,13%)	11 (0,87%)	0
		B	4095	4004 (97,78%)	49 (1,20%)	42 (1,03%)
		C	1776	1733 (97,58%)	30 (1,69%)	13 (0,73%)
	OK-1	A	3328	2888 (86,78%)	285 (8,56%)	155 (4,66%)
		B	4634	4104 (88,56%)	350 (7,55%)	180 (3,88%)
		C	2738	2346 (85,68%)	205 (7,49%)	187 (6,83%)
<i>hNANOG</i>	NL-1	A	274	261 (95,26%)	13 (4,74%)	0
		B	267	240 (89,89%)	17 (6,37%)	10 (3,75%)
		C	683	658 (96,34%)	19 (2,78%)	6 (0,88%)
	NK-1	A	1058	1007 (95,18%)	36 (3,40%)	15 (1,42%)
		B	147	144 (97,96%)	2 (1,36%)	1 (0,68%)
		C	2187	2092 (95,66%)	61 (2,79%)	34 (1,55%)
	OL-1	A	687	661 (96,22%)	25 (3,64%)	1 (0,15%)
		B	1681	1634 (97,20%)	42 (2,50%)	5 (0,30%)
		C	683	660 (96,63%)	17 (2,49%)	6 (0,88%)
	OK-1	A	1505	1432 (95,15%)	56 (3,72%)	17 (1,13%)
		B	2095	1994 (95,18%)	82 (3,91%)	19 (0,91%)
		C	1137	1071 (94,20%)	38 (3,34%)	28 (2,46%)

Gen	Gruppe	Triplett	Reads gesamt	Normal	Intermediär	Abnormal
<i>hOCT4</i>	NL-1	A	522	489 (93,68%)	30 (5,75%)	3 (0,57%)
		B	86	79 (91,86%)	6 (6,98%)	1 (1,16%)
		C	176	168 (95,45%)	6 (3,41%)	2 (1,14%)
	NK-1	A	168	160 (95,24%)	6 (3,57%)	1 (1,19%)
		B	265	252 (95,09%)	13 (4,91%)	0
		C	686	630 (91,84%)	51 (7,43%)	5 (0,73%)
	OL-1	A	394	383 (97,21 %)	11 (2,79%)	0
		B	883	855 (96,83%)	28 (3,17%)	0
		C	482	463 (96,06%)	18 (3,73%)	1 (0,21%)
	OK-1	A	417	395 (94,72%)	22 (5,28%)	0
		B	1102	987 (89,56%)	101 (9,17%)	14 (1,27%)
		C	43	40 (93,02%)	1 (2,33%)	2 (4,65%)

Die Triplets einer Probe variierten teilweise untereinander hinsichtlich der erhaltenen Anzahl an Reads. Insgesamt aber waren die Triplets einer Probe untereinander sehr ähnlich. Wenn eine Probe viel Abnormalität besaß, dann zeigte sich dies sowohl in Proben, für die wenige Reads erhalten wurden, als auch in Proben mit mehr Reads. Hinsichtlich des Anteils intermediär methylierter Allele zeichnete sich auch hier ab, dass die Triplets einer Probe untereinander sehr ähnliche Ergebnisse lieferten. Da die Methode an sich stabil schien, wurden sämtliche anderen Proben nicht als Triplets, sondern nur einfach untersucht. Für die finale Analyse der DBS-Ergebnisse wurde von den Triplett-Ansätzen nur die Probe genommen, die die meisten Reads aufwies, da die anderen Proben auch nur einfach getestet worden waren.

Die Gesamtanalyse aller untersuchten Spermienproben zeigte, dass die meisten der untersuchten Allele normal methyliert waren. Der Mittelwert aller normal methylierten Allele aller untersuchten Spermien aller Gene zusammengefasst lag bei 95,19% \pm 3,71, wobei das Minimum bei 78,87% normal methylierter Allele lag und das Maximum bei 99,90%. Der Mittelwert abnorm methylierter Allele betrug 0,99% \pm 1,87 mit einem Minimum von 0,00% und einem Maximum von 13,92%. Intermediär methyliert waren 3,82% \pm 2,81 aller untersuchten Allele mit einem Minimum von 0,10% und einem Maximum von 12,27%.

Für *hGTL2* waren in den verschiedenen Spermiengruppen 0,19 bis 1,75% aller Allele abnorm methyliert, für *hPEG3* wurden 0,14 bis 1,90% abnorme Allele in den verschiedenen Spermiengruppen detektiert, *hNANOG* zeigte 0,92 bis 1,62% Abnormalität und für *hOCT4* wurden 0,48 bis 2,68% Abnormalität gefunden (siehe Tabelle 3-27). Die meisten abnorm methylierten Allele wurden in der OAT-Gruppe ohne Schwangerschaft (OK) gefunden, während die anderen Gruppen mit normalem Spermio-

ogramm sowie die OL-Gruppe relativ wenige abnorme Reads aufwies. Die Methylierungsmittelwerte einzelner Proben sind in Tabelle 3-28 angegeben.

Tabelle 3-27: Anteil normal und abnorm methylierter Reads aller Proben der verschiedenen untersuchten Spermigruppen.

Abnorme Reads zeigen für $\geq 50\%$ aller analysierten CpGs des Allels das falsche Methylierungsmuster. Alle vollständig normal methylierten Allele, sowie intermediär methylierte Allele sind hier zunächst unter dem Begriff normal zusammengefasst. Rot dargestellt sind Gruppen die für mehr als 1% aller ihrer sequenzierten Reads ein abnormes Methylierungsmuster zeigten.

		NL	NK	OL	OK
<i>hGTL2</i>	Mittelwert Methylierung [%]	95,2	95,1	94,1	93,9
	Anzahl normale Reads	13951	19185	18018	11382
	% normale Reads	99,81	99,55	99,75	98,25
	Anzahl abnorme Reads	26	86	46	203
	% abnorme Reads	0,19	0,45	0,25	1,75
<i>hPEG3</i>	Mittelwert Methylierung [%]	0,9	0,7	0,8	3,3
	Anzahl normale Reads	15774	24313	17229	21692
	% normale Reads	99,82	99,86	99,69	98,10
	Anzahl abnorme Reads	29	33	53	421
	% abnorme Reads	0,18	0,14	0,31	1,90
<i>hNANOG</i>	Mittelwert Methylierung [%]	96,8	96,5	96,2	96,1
	Anzahl normale Reads	12723	16144	12809	10349
	% normale Reads	99,08	99,02	98,45	98,38
	Anzahl abnorme Reads	118	160	202	170
	% abnorme Reads	0,92	0,98	1,55	1,62
<i>OCT4</i>	Mittelwert Methylierung [%]	92,4	93,1	92,9	90,2
	Anzahl normale Reads	6150	8863	7313	6401
	% normale Reads	99,31	99,52	99,52	97,32
	Anzahl abnorme Reads	43	43	35	176
	% abnorme Reads	0,69	0,48	0,48	2,68

Tabelle 3-28: Methylierungsmittelwerte in Prozent aller einzelnen analysierten Proben.

Für *hOCT4* wurden für die Proben OK-4, 8, 10 und 14 keine Ergebnisse erhalten.

Proben-Nr.	NL				NK				OL				OK			
	<i>hGTL2</i> [%]	<i>hPEG3</i> [%]	<i>hNANOG</i> [%]	<i>hOCT4</i> [%]	<i>hGTL2</i> [%]	<i>hPEG3</i> [%]	<i>hNANOG</i> [%]	<i>hOCT4</i> [%]	<i>hGTL2</i> [%]	<i>hPEG3</i> [%]	<i>hNANOG</i> [%]	<i>hOCT4</i> [%]	<i>hGTL2</i> [%]	<i>hPEG3</i> [%]	<i>hNANOG</i> [%]	<i>hOCT4</i> [%]
1	93,9	1,0	96,4	91,3	95,7	0,6	96,5	90,8	96,5	1,6	97,5	92,9	91,8	5,8	96,7	88,1
2	95,0	0,9	97,5	93,2	94,4	0,7	96,1	91,5	93,3	0,4	95,2	90,9	95,2	2,0	93,0	87,5
3	95,9	0,8	97,2	93,9	95,6	0,4	97,6	92,2	93,5	0,8	97,7	92,7	96,5	0,6	97,6	94,4
4	95,2	0,8	98,1	93,9	94,2	0,7	97,0	92,8	94,3	0,7	97,5	94,0	96,9	0,6	97,5	-
5	97,3	0,6	96,6	92,0	95,3	1,2	97,4	94,3	94,5	0,9	97,6	93,6	94,6	1,4	96,3	93,0
6	93,2	0,9	97,0	93,5	94,4	0,9	95,5	93,1	97,1	1,0	97,3	92,6	95,2	1,6	95,9	93,2
7	94,2	2,1	98,7	92,9	95,8	0,4	97,1	93,4	86,5	1,4	96,5	98,0	96,3	0,7	96,8	89,3
8	95,0	0,8	96,9	92,3	95,3	0,6	95,2	93,4	94,4	0,8	93,8	91,3	92,9	13,4	97,1	-
9	96,0	0,5	95,4	93,6	95,5	0,4	95,8	93,1	96,4	0,6	93,8	92,3	94,3	1,4	97,0	93,3
10	95,6	0,5	96,9	93,7	94,6	0,6	97,4	92,6	95,4	0,6	97,1	93,9	86,9	8,5	97,3	-
11	94,8	1,0	92,8	85,3	95,6	0,5	95,9	91,4	93,6	0,6	96,0	88,6	92,8	0,4	93,5	85,0
12	95,5	1,5	97,7	93,5	95,7	0,8	95,1	94,2	96,0	0,6	93,2	94,2	92,9	2,2	98,3	84,6
13	95,8	0,9	97,3	91,6	94,6	0,9	97,2	96,1	92,3	0,6	97,1	93,3	95,7	0,9	96,5	93,4
14	-	-	-	-	95,0	0,9	96,7	94,1	-	-	-	-	93,0	6,1	92,4	-

Zwischen den Genen wurden Unterschiede in der Häufigkeit intermediär methylierter Allele beobachtet. Am häufigsten zeigte *hGTL2* mit $6,47\% \pm 2,46$ aller Allele intermediäre Methylierungsmuster, gefolgt von *hOCT4* ($4,83\% \pm 2,32$), *hNANOG* ($2,87\% \pm 1,38$) und *hPEG3* ($1,18\% \pm 1,51$) (siehe Tabelle 3-29). Mittels ANOVA mit Bonferroni post hoc Test zeigte sich, dass dieser Unterschied zwischen den Genen statistisch signifikant ist ($p\text{-Wert} < 0,001$). Die p -Werte der einzelnen Vergleiche der Gene hinsichtlich ihrer Prozentanteile normal, intermediär und abnorm methylierter Allele sind in Tabelle 3-30 angegeben. Bezüglich der Häufigkeit abnorm methylierter Allele konnte kein Unterschied zwischen den Genen festgestellt werden. Innerhalb der Proben der NL-Gruppe zeigten für *hGTL2* 1,93 bis 12,20% aller Allele ein intermediäres Methylierungsmuster (siehe Tabelle 3-31), während für *hPEG3* 0,12 bis 4,72% der Allele einer Probe intermediär methyliert waren (siehe Tabelle 3-32). Für *hNANOG* waren 1,34 bis 3,61% der Allele intermediär methyliert (siehe Tabelle 3-33) und für *hOCT4* reichte die Spannweite von 2,00 bis 5,71% (siehe Tabelle 3-34). Für die Proben der NK-Gruppe zeigten für *hGTL2* 4,38 bis 7,56% der Allele intermediäre Methylierung, für *hPEG3* 0,10 bis 1,28%, für *hNANOG* 1,83 bis 4,82% und für *hOCT4* 1,42 bis 7,43%. In der OL-Gruppe zeigten für *hGTL2* 3,54 bis 12,27% der Allele intermediäre Muster, für *hPEG3* 0,25 bis 1,74%, für *hNANOG* 0,81 bis 6,68% und für *hOCT4* 0,86 bis 9,51%. Innerhalb der OK-Gruppe zeigten für *hGTL2* 1,38 bis 11,51% der Allele intermediäre Methylierung, für *hPEG3* 0,15 bis 7,76%, für *hNANOG* 0,88 bis 6,25% und für *hOCT4* 3,44 bis 11,68%.

Tabelle 3-29: Unterschiede in den Häufigkeiten normaler, abnormer und intermediärer Methylierung der untersuchten Allele zwischen den verschiedenen Genen.

Die p -Werte wurden mittels ANOVA-Test mit dem SPSS-Programm ermittelt. Ein $p\text{-Wert} \leq 0,05$ ist signifikant.

Methylierung	Gen	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	p-Wert ANOVA
Normal [%]	<i>hGTL2</i>	92,74	3,37473	78,87	97,94	< 0,0001
	<i>hPEG3</i>	98,06	3,05223	85,37	99,90	
	<i>hNANOG</i>	95,87	2,37116	88,89	98,66	
	<i>hOCT4</i>	94,01	3,60922	82,36	98,99	
Abnormal [%]	<i>hGTL2</i>	0,79	1,96673	0,00	13,92	0,388
	<i>hPEG3</i>	0,75	2,07175	0,00	12,12	
	<i>hNANOG</i>	1,26	1,41748	0,00	5,56	
	<i>hOCT4</i>	1,16	1,96096	0,00	8,43	
Intermediär [%]	<i>hGTL2</i>	6,47	2,46117	1,38	12,27	< 0,0001
	<i>hPEG3</i>	1,18	1,50552	0,10	7,76	
	<i>hNANOG</i>	2,87	1,37955	0,81	6,68	
	<i>hOCT4</i>	4,83	2,32411	0,86	11,68	

Tabelle 3-30: Vergleich der einzelnen Gene hinsichtlich ihrer Prozentanteile normal, intermediär und abnorm methylierter Allele.

Die p-Werte wurden mit der Bonferroni-Methode mit dem Programm SPSS ermittelt. P-Werte für die 0,000 angegeben ist, sind alle $< 0,0001$. P-Werte $\leq 0,05$ sind signifikant.

	<i>hGTL2</i>			<i>hPEG3</i>			<i>hNANOG</i>		
	Normal	Inter	Abnorm	Normal	Inter	Abnorm	Normal	Inter	Abnorm
<i>hPEG3</i>	0,000	0,000	1,000						
<i>hNANOG</i>	0,000	0,000	1,000	0,002	0,000	0,947			
<i>hOCT4</i>	0,237	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,017	0,000	1,000

Die geprägten Gene *hGTL2* und *hPEG3* zeigten für alle untersuchten Spermengruppen, mit Ausnahme der OK-Gruppe, insgesamt wenig abnorm methylierte Reads. Für die meisten Proben waren weniger als 1% aller von einer Probe analysierten Allele abnorm methyliert. Die Probe NK-10 wies für *hGTL2* für 1,49% ihrer insgesamt analysierten Reads abnorme Methylierungsmuster auf, während alle anderen Proben der NL-, NK- und OL-Gruppen weniger als 1% abnorme Allele zeigten (siehe Tabelle 3-31 und Abbildung 3-14). Die OK-Gruppe hingegen zeigte für 5 der 14 untersuchten Proben für *hGTL2* 1,26 bis 13,92% Abnormalität. Für *hPEG3* zeigte die Probe NL-7 1,70% Abnormalität und die Probe OL-1 1,03% (siehe Tabelle 3-32 und Abbildung 3-15). Innerhalb der OK-Gruppe wurden 5 Proben identifiziert, die 1,51 bis 12,12% Abnormalität aufwiesen. Die Pluripotenzgene *hNANOG* und *hOCT4* wiesen insgesamt für alle Spermengruppen mehr Proben mit einer Abnormalitätsrate von mehr als 1% auf. Innerhalb der NL-Gruppe zeigten 2 Proben für *hNANOG* (1,86%, 4,28%; siehe Tabelle 3-33 und Abbildung 3-16) und 3 Proben für *hOCT4* (2,04 bis 8,09%; siehe Tabelle 3-34 und Abbildung 3-17) mehr als 1% abnorme Methylierung, die NK-Gruppe hatte 7 solcher Proben für *hNANOG* (1,22 bis 2,74%) und 2 Proben für *hOCT4* (1,06, 1,16%) und die OL-Gruppe wies 6 Proben für *hNANOG* (1,18 bis 4,47%) auf und 2 Proben für *hOCT4* (1,30, 3,94%). Die meisten Proben mit mehr als 1% Abnormalität zeigte wieder die OK-Gruppe, in der 8 Proben für *hNANOG* (1,25 bis 5,56%) und 6 Proben für *hOCT4* (1,15 bis 8,43%) Abnormalität von mehr als 1% zeigten. Solche Proben, die für ein Gen mehr als 1% abnorm methylierte Allele zeigten, besaßen für die anderen Gene jedoch oftmals weniger abnorme Allele (siehe Tabelle 3-35). Nur die Proben NL-11, NK-11 und OL-9 und OL-11 zeigten für beide Pluripotenzgene mehr als 1% abnorme Allele. Für die OK-Gruppe zeigten insgesamt 10 von 14 untersuchten Proben für wenigstens ein Gen mehr als 1% abnorme Allele. Hiervon zeigte nur eine Probe für nur ein Gen (*hOCT4*) mehr als 1% Abnormalität,

während 4 Proben für 2 Gene mehr als 1% Abnormalität zeigten. Davon waren in 3 Proben nur die Pluripotenzgene betroffen und die vierte Probe hatte eine erhöhte Abnormalität für *hGTL2* und *hNANOG*. Die anderen 5 Proben zeigten für insgesamt 3 Gene, sowohl für Pluripotenzgene als auch für geprägte Gene, eine Abnormalität von mehr als 1% (siehe Tabelle 3-35). Insgesamt hatten in der NL-Gruppe nur 5 der 13 untersuchten Proben für ein oder mehrere Gene mehr als 1% Abnormalität, während es in der OL-Gruppe 7 Proben waren und in den Gruppen NK und OK, für die keine Schwangerschaft etabliert werden konnte, waren 9 bzw. 10 von jeweils 14 Proben betroffen (siehe Tabelle 3-36).

Tabelle 3-31: Übersicht für *hGTL2*: Prozentanteile normal methylierter, intermediärer und abnorm methylierter Allele.

In Klammern sind die jeweiligen Readzahlen gegeben. Rot: Proben mit mehr als 1% abnormer Methylierung. Grün: Proben ohne abnorme Reads.

<i>hGTL2</i>	NL			NK			OL			OK		
	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]
1	90,19 (1398)	9,42 (146)	0,39 (6)	93,88 (2118)	5,81 (131)	0,31 (7)	95,99 (2084)	3,92 (85)	0,09 (2)	86,35 (2030)	9,15 (215)	4,51 (106)
2	94,15 (708)	5,45 (41)	0,40 (3)	92,15 (1913)	7,56 (157)	0,29 (6)	90,75 (471)	8,86 (46)	0,39 (2)	92,05 (1621)	6,98 (123)	0,97 (17)
3	94,51 (1378)	5,49 (80)	0,00	95,08 (695)	4,38 (32)	0,55 (4)	90,27 (677)	9,60 (72)	0,13 (1)	96,76 (628)	3,24 (21)	0,00
4	93,97 (1466)	6,03 (94)	0,00	92,01 (564)	7,34 (45)	0,65 (4)	92,75 (1394)	6,85 (103)	0,40 (6)	97,93 (142)	1,38 (2)	0,69 (1)
5	97,94 (760)	1,93 (15)	0,13 (1)	93,70 (2365)	5,59 (141)	0,71 (18)	93,87 (567)	5,96 (36)	0,17 (1)	91,57 (880)	7,80 (75)	0,62 (6)
6	87,62 (474)	12,20 (66)	0,18 (1)	92,18 (1202)	6,98 (91)	0,84 (11)	95,96 (1212)	3,96 (50)	0,08 (1)	93,40 (963)	5,33 (55)	1,26 (13)
7	92,73 (408)	7,05 (31)	0,23 (1)	94,37 (2196)	5,45 (127)	0,17 (4)	94,03 (4189)	5,68 (253)	0,29 (13)	94,85 (1013)	4,59 (49)	0,56 (6)
8	92,82 (478)	6,99 (36)	0,24 (1)	93,72 (1254)	6,13 (82)	0,15 (2)	93,46 (900)	6,44 (62)	0,10 (1)	88,12 (89)	8,91 (9)	2,97 (3)
9	95,22 (896)	4,68 (44)	0,11 (1)	93,83 (715)	6,04 (46)	0,13 (1)	96,31 (1957)	3,54 (72)	0,15 (3)	91,06 (509)	8,41 (47)	0,54 (3)
10	94,14 (1237)	5,71 (75)	0,15 (2)	93,68 (504)	4,83 (26)	1,49 (8)	93,98 (1171)	5,70 (71)	0,32 (4)	78,87 (153)	7,22 (14)	13,92 (27)
11	94,69 (481)	4,72 (24)	0,59 (3)	93,66 (1477)	5,83 (92)	0,51 (8)	90,64 (465)	9,36 (48)	0,00	88,01 (778)	11,43 (101)	0,57 (5)
12	95,27 (2055)	4,40 (95)	0,32 (7)	94,75 (921)	5,25 (51)	0,00	95,76 (881)	3,80 (35)	0,43 (4)	87,50 (616)	11,51 (81)	0,99 (7)
13	94,81 (1389)	5,19 (76)	0,00	93,44 (1368)	5,87 (86)	0,68 (10)	87,02 (979)	12,27 (138)	0,71 (8)	95,39 (889)	4,08 (38)	0,54 (5)
14	-	-	-	94,04 (742)	5,58 (44)	0,38 (3)	-	-	-	86,94 (213)	11,43 (28)	1,63 (4)

Tabelle 3-32: Übersicht für hPEG3: Prozentanteile normal methylierter, intermediärer und abnorm methylierter Allele.

In Klammern sind die jeweiligen Readzahlen gegeben. Rot: Proben mit mehr als 1% abnormer Methylierung. Grün: Proben ohne abnorme Reads.

hPEG3	NL			NK			OL			OK		
	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]
1	98,89 (1338)	0,81 (11)	0,30 (4)	99,47 (4648)	0,51 (24)	0,02 (1)	97,78 (4004)	1,20 (49)	1,03 (42)	88,56 (4104)	7,55 (350)	3,88 (180)
2	98,80 (825)	1,20 (10)	0,00	99,10 (3095)	0,74 (23)	0,16 (5)	99,51 (609)	0,49 (3)	0,00	97,37 (6581)	1,12 (76)	1,51 (102)
3	99,24 (1041)	0,76 (8)	0,00	99,89 (906)	0,11 (1)	0,00	98,77 (882)	1,23 (11)	0,00	99,79 (935)	0,21 (2)	0,00
4	98,46 (1603)	1,47 (24)	0,06 (1)	99,12 (564)	0,88 (5)	0,00	99,07 (1273)	0,93 (12)	0,00	99,26 (403)	0,74 (3)	0,00
5	98,95 (752)	1,05 (8)	0,00	98,58 (2020)	0,54 (11)	0,88 (18)	99,19 (979)	0,51 (5)	0,30 (3)	97,80 (1245)	1,41 (18)	0,79 (10)
6	98,94 (745)	0,66 (5)	0,40 (3)	98,48 (1099)	1,08 (12)	0,45 (5)	98,51 (1194)	1,40 (17)	0,08 (1)	97,19 (1036)	1,97 (21)	0,84 (9)
7	97,21 (628)	1,08 (7)	1,70 (11)	99,90 (1970)	0,10 (2)	0,00	98,26 (792)	1,74 (14)	0,00	98,79 (1065)	1,21 (13)	0,00
8	99,64 (827)	0,12 (1)	0,24 (2)	99,45 (1265)	0,55 (7)	0,00	99,02 (506)	0,78 (4)	0,20 (1)	86,53 (257)	1,35 (4)	12,12 (36)
9	99,36 (1549)	0,64 (10)	0,00	99,59 (981)	0,41 (4)	0,00	99,75 (791)	0,25 (2)	0,00	97,77 (921)	1,59 (15)	0,64 (6)
10	99,61 (1264)	0,39 (5)	0,00	99,37 (629)	0,63 (4)	0,00	99,44 (1765)	0,45 (8)	0,11 (2)	85,37 (671)	7,76 (61)	6,87 (54)
11	98,58 (624)	4,72 (7)	0,59 (2)	99,72 (2469)	0,24 (6)	0,04 (1)	99,27 (1095)	0,73 (8)	0,00	99,85 (1298)	0,15 (2)	0,00
12	98,28 (627)	1,10 (7)	0,63 (4)	98,94 (1493)	1,06 (16)	0,00	99,48 (1347)	0,37 (5)	0,15 (2)	94,02 (1147)	5,66 (69)	0,33 (4)
13	99,30 (3823)	0,65 (25)	0,05 (2)	98,57 (2000)	1,28 (26)	0,15 (3)	99,52 (1847)	0,38 (7)	0,11 (2)	98,83 (1097)	1,08 (12)	0,09 (1)
14	-	-	-	98,84 (1021)	1,16 (12)	0,00	-	-	-	92,46 (282)	1,31 (4)	6,23 (19)

Tabelle 3-33: Übersicht für *hNANOG*: Prozentanteile normal methylierter, intermediärer und abnorm methylierter Allele.

In Klammern sind die jeweiligen Readzahlen gegeben. Rot: Proben mit mehr als 1% abnormer Methylierung. Grün: Proben ohne abnorme Reads.

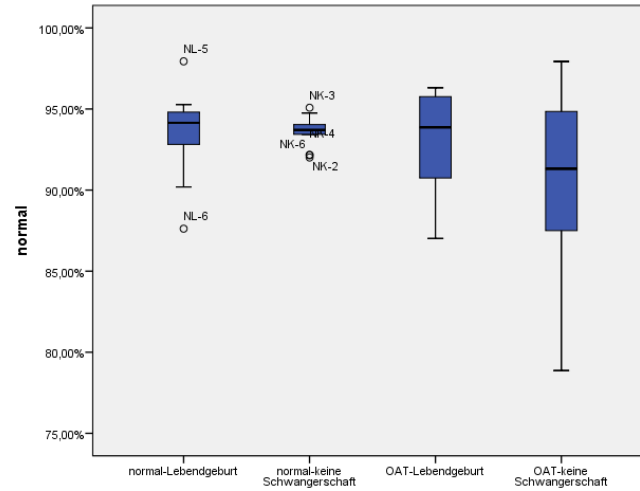
hNANOG	NL			NK			OL			OK		
	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]
1	96,34 (658)	2,78 (19)	0,88 (6)	95,66 (2092)	2,79 (61)	1,55 (34)	97,20 (1634)	2,50 (42)	0,30 (5)	95,18 (1994)	3,91 (82)	0,91 (19)
2	97,43 (569)	2,23 (13)	0,34 (2)	94,51 (2464)	4,68 (122)	0,81 (21)	92,49 (554)	6,68 (40)	0,83 (5)	91,03 (1278)	3,92 (55)	5,06 (71)
3	97,27 (999)	2,04 (21)	0,68 (7)	97,55 (677)	2,16 (15)	0,29 (2)	98,44 (694)	1,56 (11)	0,00	98,06 (760)	1,94 (15)	0,00
4	98,19 (1195)	1,81 (22)	0,00	97,47 (386)	2,27 (9)	0,25 (1)	97,63 (743)	1,18 (9)	1,18 (9)	96,30 (130)	3,70 (5)	0,00
5	97,77 (482)	1,42 (7)	0,81 (4)	97,25 (2051)	2,42 (51)	0,71 (7)	98,09 (720)	1,91 (14)	0,00	96,28 (853)	2,37 (21)	1,35 (12)
6	97,25 (1664)	2,05 (35)	0,70 (12)	94,73 (863)	3,84 (35)	1,43 (13)	98,12 (989)	1,39 (14)	0,50 (5)	95,84 (968)	2,38 (24)	1,78 (18)
7	98,66 (294)	1,34 (4)	0,00	96,91 (1566)	2,78 (45)	0,31 (5)	95,97 (595)	0,81 (5)	3,23 (20)	97,57 (882)	0,88 (8)	1,55 (14)
8	96,88 (1181)	2,63 (32)	0,49 (6)	94,51 (827)	2,74 (24)	2,74 (24)	92,77 (949)	3,42 (35)	3,81 (39)	92,50 (148)	6,25 (10)	1,25 (2)
9	94,54 (917)	3,61 (35)	1,86 (18)	95,01 (571)	3,66 (22)	1,33 (8)	91,69 (1026)	3,84 (43)	4,47 (50)	98,12 (1254)	1,88 (24)	0,00
10	96,50 (1296)	3,13 (42)	0,37 (5)	97,21 (244)	2,79 (7)	0,00	97,76 (1004)	1,95 (20)	0,29 (3)	96,10 (74)	2,60 (2)	1,30 (1)
11	92,12 (1076)	3,60 (42)	4,28 (50)	94,82 (1317)	3,67 (51)	1,51 (21)	95,23 (1416)	2,56 (38)	2,22 (33)	90,88 (658)	6,08 (44)	3,04 (22)
12	98,11 (1451)	1,42 (21)	0,47 (7)	93,27 (638)	4,82 (33)	1,90 (13)	91,21 (643)	4,82 (34)	3,97 (28)	98,44 (316)	1,56 (5)	0,00
13	98,31 (638)	1,54 (10)	0,15 (1)	97,77 (1139)	2,15 (25)	0,09 (1)	97,34 (1501)	2,33 (36)	0,32 (5)	94,72 (574)	4,79 (29)	0,50 (3)
14	-	-	-	96,95 (794)	1,83 (15)	1,22 (10)	-	-	-	88,89 (128)	5,56 (8)	5,56 (8)

Tabelle 3-34: Übersicht für hOCT4: Prozentanteile normal methylierter, intermediärer und abnorm methylierter Allele.

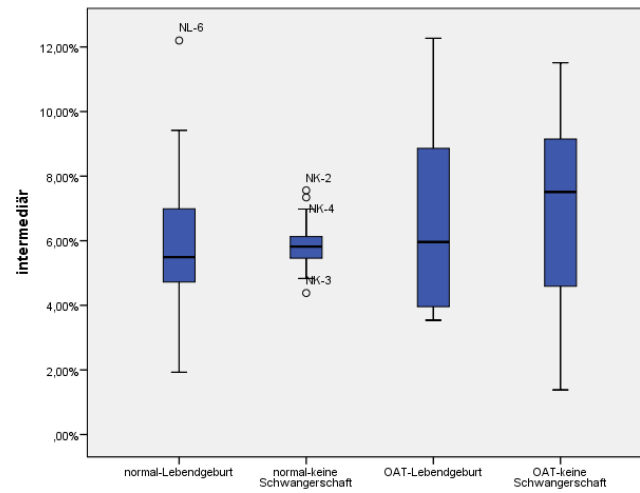
In Klammern sind die jeweiligen Readzahlen gegeben. Rot: Proben mit mehr als 1% abnormer Methylierung. Grün: Proben ohne abnorme Reads. Für die Proben ON-4, ON-8, ON-10 und ON-14 wurden keine Reads erhalten.

hOCT4	NL			NK			OL			OK		
	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]	Normal [%]	Intermediär [%]	Abnorm [%]
1	93,68 (489)	5,75 (30)	0,57 (3)	91,84 (630)	7,43 (51)	0,73 (5)	96,83 (855)	3,17 (28)	0,00	89,56 (987)	9,17 (101)	1,27 (14)
2	95,59 (260)	4,04 (11)	0,37 (1)	93,65 (177)	5,29 (10)	1,06 (2)	93,55 (174)	6,45 (12)	0,00	85,18 (569)	8,38 (56)	6,44 (43)
3	97,23 (562)	2,60 (15)	0,17 (1)	96,45 (299)	2,90 (9)	0,65 (2)	94,74 (126)	5,26 (7)	0,00	96,56 (253)	3,44 (9)	0,00
4	95,33 (979)	4,48 (46)	0,19 (2)	94,49 (223)	4,66 (11)	0,85 (2)	97,17 (721)	2,56 (19)	0,27 (2)	-	-	-
5	94,39 (185)	(7)	2,04 (4)	97,07 (1492)	2,41 (37)	0,52 (8)	95,82 (293)	4,85 (15)	0,32 (1)	95,22 (498)	3,63 (19)	1,15 (6)
6	95,87 (325)	3,83 (13)	0,29 (1)	95,84 (737)	3,77 (29)	0,39 (3)	95,77 (611)	4,08 (26)	0,16 (1)	95,14 (823)	4,28 (37)	0,58 (5)
7	94,78 (109)	4,35 (5)	0,87 (1)	95,21 (1034)	4,42 (48)	0,37 (4)	98,99 (689)	0,86 (6)	0,14 (1)	87,06 (592)	10,74 (73)	2,21 (15)
8	93,92 (417)	5,41 (24)	0,68 (3)	95,89 (607)	3,95 (25)	0,16 (1)	91,16 (196)	7,91 (17)	0,93 (2)	-	-	-
9	96,39 (747)	3,48 (27)	0,13 (1)	94,94 (507)	4,87 (26)	0,19 (1)	94,81 (219)	3,90 (9)	1,30 (3)	94,81 (256)	4,44 (12)	0,74 (2)
10	95,61 (1089)	4,30 (49)	0,09 (1)	93,54 (304)	5,85 (19)	0,62 (2)	95,89 (1002)	3,92 (41)	0,19 (2)	-	-	-
11	86,03 (234)	5,88 (16)	8,09 (22)	92,38 (715)	6,46 (50)	1,16 (9)	86,54 (373)	9,51 (41)	3,94 (17)	82,36 (733)	9,21 (82)	8,43 (75)
12	96,98 (450)	3,02 (14)	0,00	96,86 (493)	2,95 (15)	0,20 (1)	96,90 (657)	2,65 (18)	0,44 (3)	86,80 (743)	11,68 (100)	1,52 (13)
13	92,00 (46)	2,00 (1)	6,00 (3)	98,46 (765)	1,42 (11)	0,13 (1)	95,69 (1111)	4,05 (47)	0,26 (3)	95,01 (438)	4,34 (20)	0,65 (3)
14	-	-	-	95,75 (518)	3,88 (21)	0,37 (2)	-	-	-	-	-	-

A



B



C

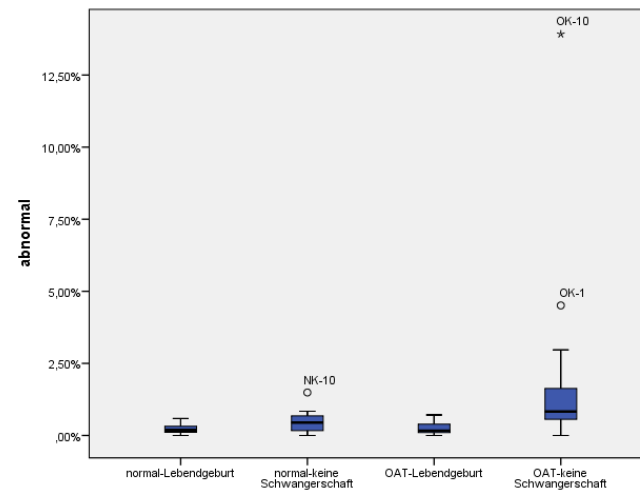


Abbildung 3-14: *hGTL2* Boxplot-Darstellung der DBS-Ergebnisse für die verschiedenen Spermien-
gruppen.

A: Prozentanteile normal methylierter Allele. B: Prozentanteile intermediär methylierter Allele. C: Prozentanteile abnorm methylierter Allele. Ausreißer und Extremwerte sind durch Kreise bzw. Sterne zusammen mit der Probennummer gegeben.

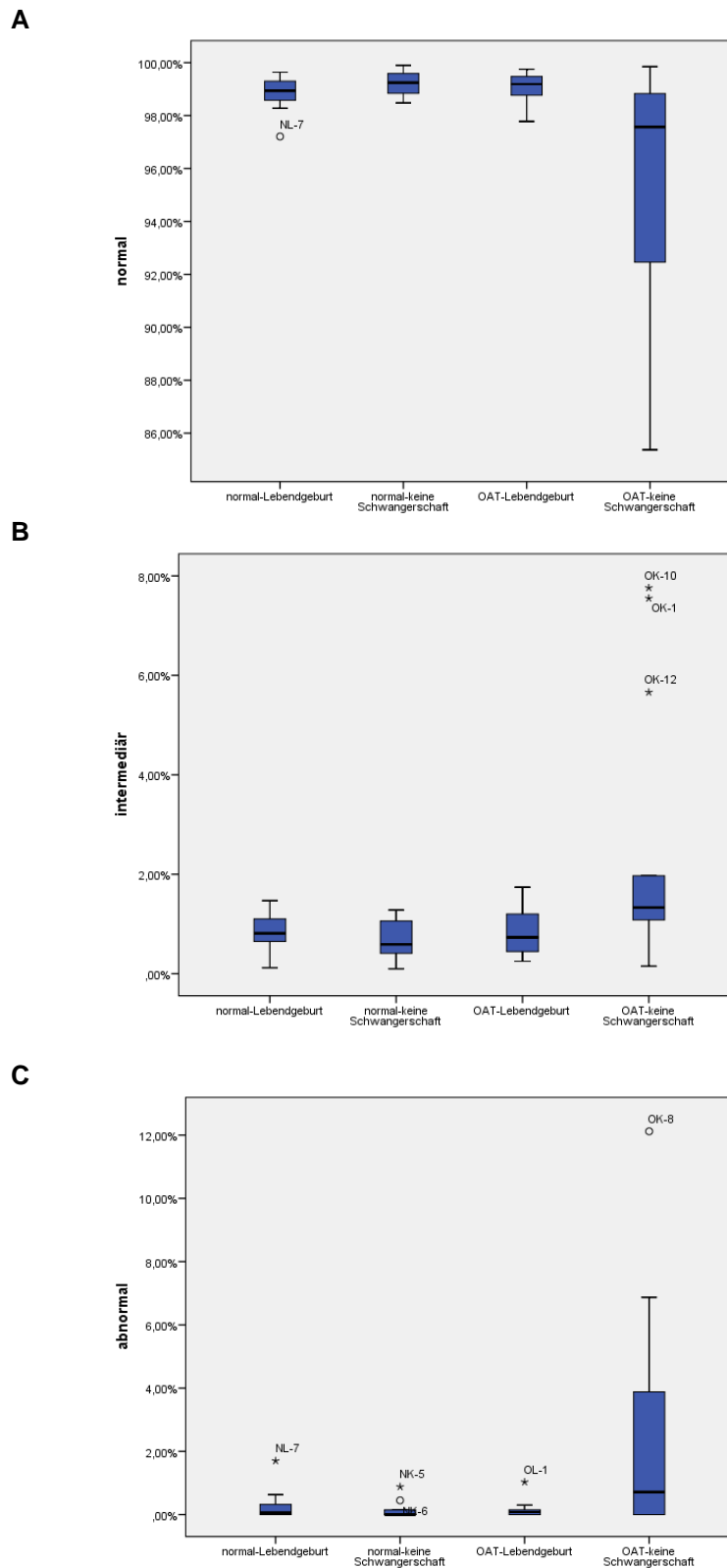
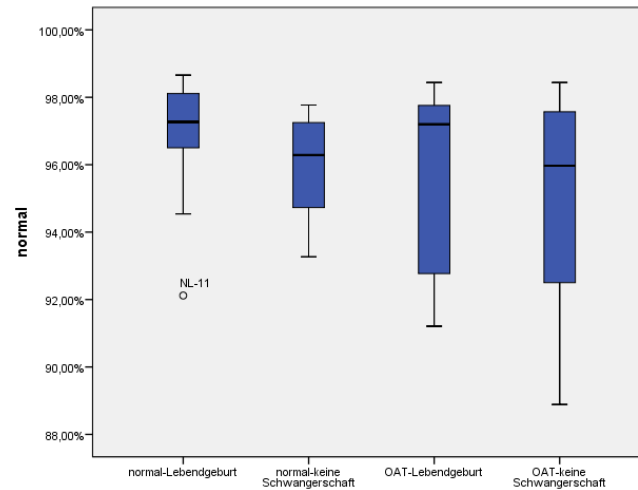


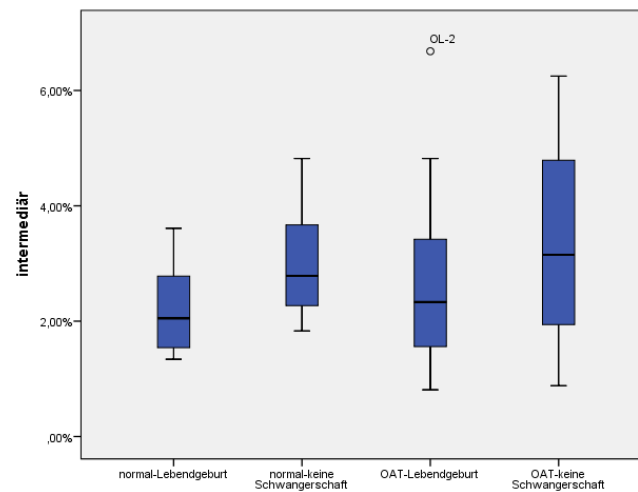
Abbildung 3-15: hPEG3 Boxplot-Darstellung der DBS-Ergebnisse.

A: Prozentanteile normal methylierter Allele. B: Prozentanteile intermediär methylierter Allele. C: Prozentanteile abnorm methylierter Allele. Ausreißer und Extremwerte sind durch Kreise bzw. Sterne zusammen mit der Probennummer gegeben.

A



B



C

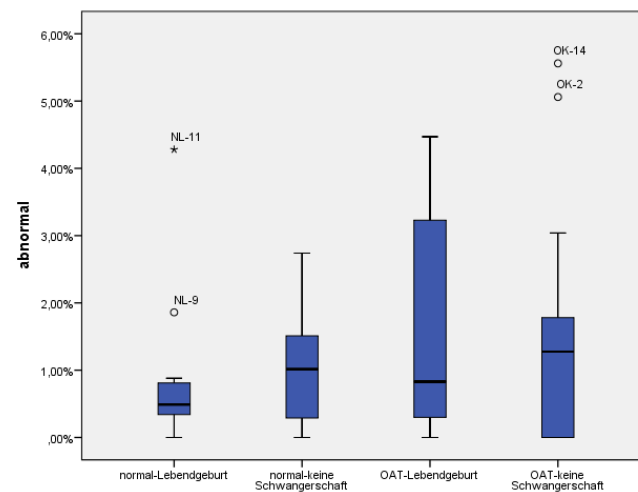
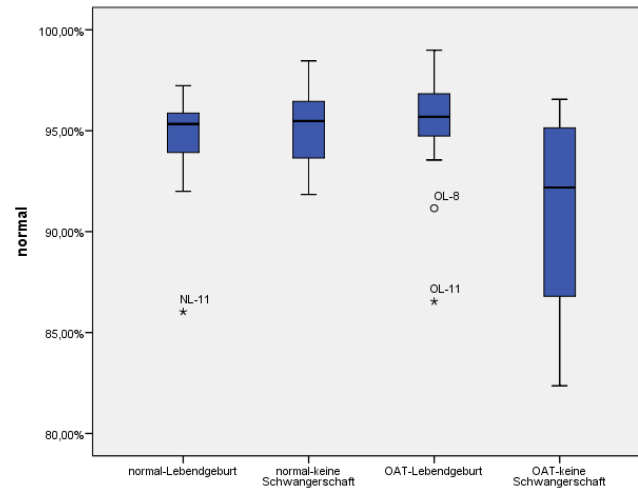


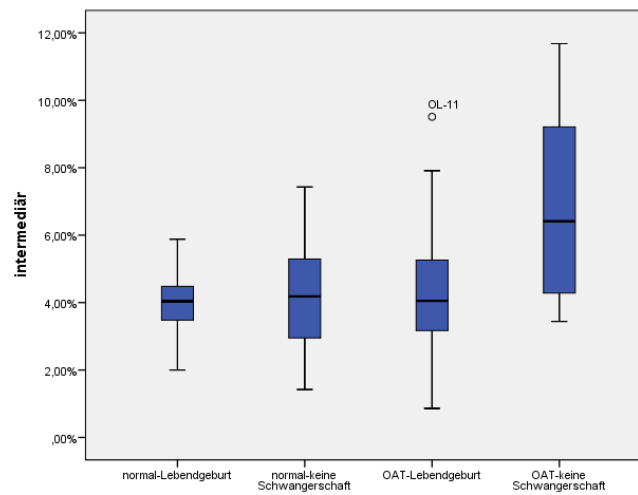
Abbildung 3-16: *hNANOG* Boxplot-Darstellung der DBS-Ergebnisse.

A: Prozentanteile normal methylierter Allele. B: Prozentanteile intermediär methylierter Allele. C: Prozentanteile abnorm methylierter Allele. Ausreißer und Extremwerte sind durch Kreise bzw. Sterne zusammen mit der Probennummer gegeben.

A



B



C

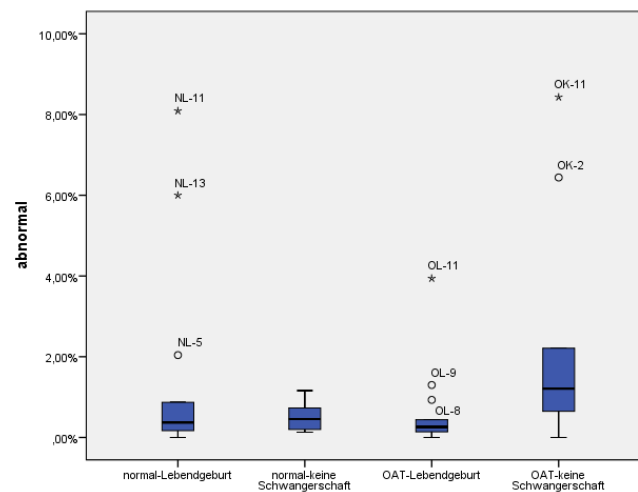


Abbildung 3-17: *hOCT4* Boxplot-Darstellung der DBS-Ergebnisse.

A: Prozentanteile normal methylierter Allele. B: Prozentanteile intermediär methylierter Allele. C: Prozentanteile abnorm methylierter Allele. Ausreißer und Extremwerte sind durch Kreise bzw. Sterne zusammen mit der Probennummer gegeben.

Tabelle 3-35: Proben mit erhöhtem Anteil abnormer Allele in mindestens einem Gen.

Gegenüberstellung aller Abnormitätsraten (in Prozent) der verschiedenen untersuchten Gene jeder dieser Proben. Rot: > 1% aller Reads der jeweiligen Probe abnorm methyliert. Grün: keine abnorm methylierten Reads detektiert.

	<i>hGTL2</i> abnorme Reads [%]	<i>hPEG3</i> abnorme Reads [%]	<i>hNANOG</i> abnorme Reads [%]	<i>hOCT4</i> abnorme Reads [%]
NL-5	0,13	0,00	0,81	2,04
NL-7	0,23	1,70	0,00	0,87
NL-9	0,11	0,00	1,86	0,13
NL-11	0,59	0,59	4,28	8,09
NL-13	0,00	0,05	0,15	6,00
NK-1	0,31	0,02	1,55	0,73
NK-2	0,29	0,16	0,81	1,06
NK-6	0,84	0,45	1,43	0,39
NK-8	0,15	0,00	2,74	0,16
NK-9	0,13	0,00	1,33	0,19
NK-10	1,49	0,00	0,00	0,62
NK-11	0,51	0,04	1,51	1,16
NK-12	0,00	0,00	1,90	0,20
NK-14	0,38	0,00	1,22	0,37
OL-1	0,09	1,03	0,30	0,00
OL-4	0,40	0,00	1,18	0,27
OL-7	0,29	0,00	3,23	0,14
OL-8	0,10	0,20	3,81	0,93
OL-9	0,15	0,00	4,47	1,30
OL-11	0,00	0,00	2,22	3,94
OL-12	0,43	0,15	3,97	0,44
OK-1	4,51	3,88	0,91	1,27
OK-2	0,97	1,51	5,06	6,44
OK-5	0,62	0,79	1,35	1,15
OK-6	1,26	0,84	1,78	0,58
OK-7	0,56	0,00	1,55	2,21
OK-8	2,97	12,12	1,25	-
OK-10	13,92	6,87	1,30	-
OK-11	0,57	0,00	3,04	8,43
OK-12	0,99	0,33	0,00	1,52
OK-14	1,63	6,23	5,56	-

Tabelle 3-36: Anzahl der Proben mit mehr als 1% abnorm methylierten Allelen bzw. ohne abnorme Allele je Spermengruppe.

NL und OL: 13 Proben, NK und OK: 14 Proben. Für *hOCT4* wurden in der ON-Gruppe für 4 Proben keine Ergebnisse erhalten, weshalb hierfür nur 10 statt der ansonsten 14 Proben ausgewertet werden konnten.

Gruppe	Proben	<i>hGTL2</i>	<i>hPEG3</i>	<i>hNANOG</i>	<i>hOCT4</i>	Gesamt Proben > 1% abnorm
NL	0% abnorme Reads	3 (23,08%)	5 (38,46%)	2 (15,38%)	1 (7,69%)	-
	< 1% abnorme Reads	10 (76,92%)	7 (53,85%)	9 (69,23%)	9 (69,23%)	-
	> 1% abnorme Reads	0	1 (7,69%)	2 (15,38%)	3 (23,08%)	5 (38,46%)
NK	0% abnorme Reads	1 (7,14%)	8 (57,14%)	1 (7,14%)	0	-
	< 1% abnorme Reads	12 (85,71%)	6 (42,86%)	6 (42,86%)	12 (85,71%)	-
	> 1% abnorme Reads	1 (7,14%)	0	7 (50,00%)	2 (14,29%)	9 (64,29%)
OL	0% abnorme Reads	1 (7,69%)	6 (46,15%)	2 (15,38%)	3 (23,08%)	-
	< 1% abnorme Reads	12 (92,31%)	6 (46,15%)	5 (38,46%)	8 (61,54%)	-
	> 1% abnorme Reads	0	1 (7,69%)	6 (46,15%)	2 (15,38%)	7 (53,85%)
OK	0% abnorme Reads	1 (7,14%)	4 (28,57%)	4 (28,57%)	1 (10,00%)	-
	< 1% abnorme Reads	8 (57,14%)	5 (35,71%)	2 (14,29%)	3 (30,00%)	-
	> 1% abnorme Reads	5 (35,71%)	5 (35,71%)	8 (57,14%)	6 (60,00%)	10 (71,43%)

Der statistische Vergleich aller vier Spermengruppen insgesamt zeigte, dass insbesondere die OAT-Gruppe, die zu keiner Schwangerschaft geführt hatte, deutlich mehr abnorme Allele aufwies als die anderen Spermengruppen, insbesondere für *hGTL2*, aber in geringerem Ausmaß auch für *hPEG3* und *hOCT4*, nicht jedoch für *hNANOG* (siehe Tabelle 3-37). Für *hPEG3* zeigte sich auch, dass die OK-Gruppe mehr intermediäre Methylierung und insgesamt weniger normale Methylierung aufwies als die anderen Gruppen. Der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zeigte, dass die OAT-Gruppe, die zu einer Lebendgeburt geführt hatte, sich nicht von den beiden Gruppen mit normalen Spermienparametern unterschied. Der Vergleich der beiden Lebendgeburt-Subgruppen gegen die OK-Gruppe zeigte für *hGTL2* Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit abnormer Methylierungsmuster, die in der OK-Gruppe besonders häufig auftraten. In geringerem Ausmaß zeigten sich hier auch für *hPEG3* Unterschiede für intermediäre und normale Methylierungsmuster. Der Vergleich der NL-Gruppe mit der OK-Gruppe zeigte außerdem einen Unterschied für

hOCT4 für intermediäre Methylierung. Auch hier hatte die OK-Gruppe wieder deutlich mehr intermediär methylierte Allele als die NL-Gruppe. Der Vergleich der beiden OAT-Gruppen untereinander zeigte außerdem, dass die OL-Gruppe weniger abnorm methylierte *hOCT4*-Allele aufwies als die OK-Gruppe. Auch zwischen den beiden Spermengruppen ohne Schwangerschaft (NK, OK) zeigten sich wieder für alle Gene, außer *hNANOG*, Unterschiede. Auch hier wies die OK-Gruppe wieder deutlich mehr abnorme Allele für *hGTL2*, *hPEG3* und *hOCT4* auf, sowie mehr intermediär methylierte Allele für *hPEG3* und weniger normal methylierte Allele für *hPEG3* und *hOCT4*. Der Vergleich der beiden Gruppen mit normalen Spermienparametern (NL, NK) zeigte eine erhöhte Anzahl abnormer Methylierung für *hGTL2* in der NK-Gruppe. Außerdem besaß die NK-Gruppe mehr intermediär methylierte *hNANOG*-Allele als die NL-Gruppe. Eine Gegenüberstellung der Gruppen normaler Spermienparameter gegen die OAT-Gruppen zeigte keine Unterschiede, außer dass die OAT-Gruppen, durch die OK-Gruppe bedingt, eine leicht erhöhte Anzahl intermediär methylierter *hPEG3*-Allele aufwies. Beim Vergleich der Spermengruppen mit Lebendgeburt gegen die Gruppen ohne Schwangerschaft zeigte sich, dass auch hier wieder ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit von *hGTL2*-Epimutationen vorlag, die in den beiden Gruppen ohne Schwangerschaft deutlich häufiger auftraten. Des Weiteren zeigten diese Gruppen eine leicht erhöhte Häufigkeit für intermediäre Methylierung für *hNANOG*.

Tabelle 3-37: Statistische Auswertung der DBS-Ergebnisse.

Vergleich aller vier Spermengruppen gegeneinander, Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander und Vergleich der normalen Spermengruppen gegen die OAT-Gruppen (N:O) sowie Vergleich nach ART-Ausgang Lebendgeburt gegen keine Schwangerschaft (L:K). Tests wurden mit SPSS durchgeführt. Solche p-Werte, die nach Korrektur für multiples Testen weiterhin statistisch signifikant blieben, sind durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet.

	Gene	Alle Gruppen	NL:NK	NL:OL	NL:OK	NK:OL	NK:OK	OL:OK	N:O	L:K
Normal	<i>GTL2</i>	0,218	0,220	0,650	0,116	0,981	0,077	0,202	0,164	0,132
	<i>PEG3</i>	0,013	0,155	0,479	0,033	0,550	0,004	0,017	0,073	0,387
	<i>NANOG</i>	0,236	0,085	0,336	0,061	0,650	0,804	0,519	0,346	0,087
	<i>OCT4</i>	0,154	0,720	0,579	0,101	0,981	0,042	0,067	0,335	0,332
Intermediär	<i>GTL2</i>	0,663	0,583	0,762	0,402	0,720	0,210	0,550	0,295	0,545
	<i>PEG3</i>	0,015	0,169	0,650	0,019	0,616	0,002	0,043	0,050	0,387
	<i>NANOG</i>	0,115	0,019	0,840	0,068	0,202	0,769	0,259	0,697	0,018
	<i>OCT4</i>	0,170	0,720	0,762	0,049	0,943	0,084	0,077	0,170	0,193
Abnormal	<i>GTL2</i>	< 0,0001*	0,033	0,724	< 0,0001*	0,068	0,016	< 0,0001*	0,095	< 0,0001*
	<i>PEG3</i>	0,050	0,259	0,511	0,085	0,616	0,024	0,048	0,137	0,449
	<i>NANOG</i>	0,716	0,583	0,448	0,259	0,583	0,769	1,000	0,310	0,677
	<i>OCT4</i>	0,045	0,830	0,336	0,101	0,202	0,013	0,015	0,661	0,059

Mittels eines binär logistischen Regressionsmodells wurde getestet, ob die DBS-Daten für eines der vier verschiedenen untersuchten Gene im Hinblick auf den Anteil normal, intermediär oder abnorm methylierter Allele eine Voraussage zum ART-Ausgang geben könnte. Für die Gene *hPEG3*, *hOCT4* und *hNANOG* waren die prädiktiven Werte sehr gering, mit Werten zwischen 52,0% und 58,0%. Für *hGTL2* konnte hingegen ein stärkerer prädiktiver Wert von 77,8% erhalten werden, wenn normale und abnorm methylierte Allele als Parameter benutzt wurden. Intermediär methylierte Allele waren nicht aussagekräftig genug und wurden deshalb als Co-Variante ausgeschlossen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die OK-Gruppe die meisten epigenetischen Defekte aufwies und dass sich dies insbesondere in den geprägten Genen und hier vor allem für *hGTL2* zeigte. Ein Unterschied zwischen Spermienproben, die zu einer Lebendgeburt geführt hatten und solchen, die keine Schwangerschaft erreichen konnten, lag ebenfalls in der Häufigkeit von *hGTL2*-Epimutationen begründet.

4 Diskussion

Infertilität ist ein weltweit zunehmendes Problem, das derzeit etwa 48,5 Millionen Paare betrifft [41]. Ein Einflussfaktor ist das steigende Alter der Paare mit Kinderwunsch [41]. Erhöhtes paternales Alter ist assoziiert mit der Zunahme chromosomaler Aneuploidien in Spermien sowie Zunahme von DNA-Fragmentierung, schlechter Chromatinverpackung, Apoptose und Nekrose sowie der Abnahme von Samenvolumen, normaler Spermienmorphologie und Motilität [40, 50]. Ebenso steigt auch bei Frauen mit zunehmendem Alter die Aneuploidierate signifikant an, ebenso wie die Häufigkeit spontaner Aborte. Es kommt mit zunehmendem maternalen Alter nicht nur zu einer Abnahme der für eine Befruchtung verfügbaren Oocytenanzahl, sondern die Oocytenqualität sinkt insgesamt, wodurch bei Frauen die Fertilität beginnend ab einem Alter von 32 Jahren abnimmt [66, 67, 104]. Infertilitätsursachen sind vielfältig und beinhalten unter anderem Infektionen, genetische Faktoren, Umwelteinflüsse und Ernährung [41].

Insbesondere männliche Infertilität ist sehr komplex und nicht vollständig verstanden. Nur 15% der Fälle können genetisch erklärt werden. Etwa 30% der Fälle hingegen sind idiopathisch und die zugrunde liegenden Ursachen unbekannt [54, 160, 161]. Epigenetische Fehlregulationen könnten eine Ursache idiopathischer Infertilität sein. Für eine normale Spermienfunktion sowie für die anschließende Embryonalentwicklung ist die korrekte Methylierung der Spermien-DNA essentiell und veränderte DNA-Methylierungsmuster diverser geprägter und nicht geprägter Gene wurden bereits in verschiedenen Studien in infertilen Patienten nachgewiesen [3, 12, 28, 54, 57-59, 61, 62, 65]. Des Weiteren steht Hypomethylierung repetitiver *ALU*-Elemente in Verbindung zu wiederkehrenden Schwangerschaftsverlusten [64].

Heutzutage kann Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch mittels verschiedener ART-Techniken geholfen werden. Die erste erfolgreich durchgeführte humane IVF erfolgte im Jahr 1978 [162, 163]. ICSI wurde erstmals 1992 als Behandlungsmethode eingesetzt [164]. IVM wurde im Jahre 1991 das erste Mal am Menschen durchgeführt und seither wurden mit Hilfe dieser Methode weltweit geschätzt etwa 3000 Kinder geboren [44, 116, 121, 165]. Insgesamt wurden seit Einführung der ART weltweit etwa 4 Millionen Kinder gezeugt [42, 104]. Hinweise auf die Zunahme ART-bedingter Imprinting-Erkrankungen sind eher durch die zugrunde liegende Infertilität denn durch ART

selbst zu erklären [163]. Dies wird durch verschiedene Studien unterstützt. Sub- und infertile Paare zeigten, unabhängig davon ob sie spontan ein Kind zeugten oder mittels ART, dasselbe Risiko für Angelman-Syndrom (AS) in ihren Kindern. Des Weiteren zeigte sich ein erhöhtes AS-Risiko nur im Vergleich zu normal fertilen Paaren [113, 163]. Eine weitere Studie zeigte, dass das erhöhte Risiko für Frühgeburten mit weiblicher Infertilität assoziiert ist, im Vergleich zu normal fertilen Frauen, und dass diese Assoziation ebenfalls unabhängig davon ist, ob die infertilen Frauen eine ART-Behandlung erfahren hatten oder nicht [163, 166]. Eine weitere Studie hinsichtlich der Häufigkeiten von Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), AS und Prader-Willi-Syndrom (PWS) zeigte ebenfalls, dass nach Korrektur für die vorliegende Infertilität keine Assoziation zwischen ART und Imprinting-Erkrankungen besteht [108, 163].

Dennoch erfolgt ART zu einem Zeitpunkt, zu dem das Genom der Gameten bzw. des Embryos empfindlich für externe Einflussfaktoren ist. Prozesse wie Oocytenmaturation, *In-vitro*-Befruchtung sowie die ersten Tage der Embryonalentwicklung in Kultur stellen vielfältige externe Einflüsse dar, wodurch die epigenetische Reprogrammierung beeinflusst werden könnte [163]. Superovulation kann in Oocyten zu aberranter Methylierung verschiedener geprägter Loci führen [119, 163, 167, 168]. Eine Reduktion der zur Superovulation eingesetzten Dosis resultierte im Menschen in einer Verringerung von Aneuploidien in Präimplantationsembryonen [163, 169]. Die Sicherheit von ART ist bisher nicht abschließend geklärt.

In der hier vorgelegten Arbeit habe ich Epimutationen in humanen Keimzellen untersucht, um den Zusammenhang zwischen Epigenetik und ART von verschiedenen Blickwinkeln aus zu beleuchten. Dabei wurden drei verschiedene Projekte bearbeitet:

1.) Ist die ART-Methode IMSI besser als die konventionelle ICSI-Methode?

Es ist bekannt, dass der Anteil morphologisch normal geformter Spermatozoen mit der natürlichen Konzeptionsrate und ART-Ausgang korreliert. Die Schwangerschaftsraten nach ICSI sind jedoch, da das Spermium direkt injiziert wird, unabhängig von der Spermienmorphologie [170]. Dennoch ist man bemüht für eine Spermieninjektion das beste Spermium auszuwählen. Da die Schwangerschaftsraten nach ICSI nur bei 30% pro Embryotransfer liegen, wurde zur Spermien Selektion die IMSI-Methodik entwickelt mit dem Ziel Schwangerschaftsraten zu erhöhen [84, 170]. Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob sich IMSI-selektierte Spermien hinsichtlich Epimutatio-

nen von konventionell für ICSI selektierten Spermien unterscheiden. Da mittels Spermieninjektion DNA-Methylierungsfehler der Spermien-DNA direkt vom Vater auf das Kind übertragen werden können [63], ist es selbstverständlich von großer Bedeutung eine Methodik zu finden, mit der dieses Übertragungsrisiko minimiert werden kann. Des Weiteren befinden sich in Spermienköpfen fertiler und infertiler Männer oftmals Vakuolen [87, 88]. Inwieweit diese Vakuolen einen Einfluss auf DNA-Methylierungsmuster nehmen könnten ist bisher unbekannt und sollte hier ebenfalls untersucht werden, zumal bereits bekannt ist, dass große Nukleusvakuolen (LNVs) in Verbindung zu Chromatinkompaktionsabnormalitäten stehen [93-96].

2.) Welchen epigenetischen Einfluss hat IVM auf die Imprint-Etablierung in humanen Oocyten?

Imprints in Spermien werden bereits vor der Meiose etabliert. Im Gegensatz dazu erfolgt dies in Oocyten erst während der Meiose [163]. Genau zu diesem Zeitpunkt erfolgt die IVM. Da bekannt ist, dass durch Superovulation die Imprint-Etablierung in Oocyten gestört werden kann [119, 163, 167, 168], ist es wichtig zu klären, ob auch IVM einen Einfluss auf die Imprint-Etablierung und dementsprechend auf die Gesundheit so gezeugter Kinder haben könnte. Die bisher durchgeführten Studien in Tiermodellen sowie zur Gesundheit von IVM-Kindern geben bisher ein positives Bild [83, 116, 121]. Dennoch ist nicht abschließend geklärt, ob IVM-Oocyten mehr Epimutationen tragen als *in vivo* gereifte Oocyten, weshalb hier dieser Frage genauer nachgegangen werden sollte.

3.) Welchen epigenetischen Unterschied gibt es zwischen Spermien mit normalen Parametern und solchen von OAT-Patienten und wie wirken sich solche eventuell vorhandenen epigenetischen Unterschiede auf den ART-Ausgang aus?

Es ist bereits aus verschiedenen Studien bekannt, dass Spermien infertiler Männer veränderte Methylierungsmuster im Vergleich zu Spermien mit normalen Parametern haben. Dazu wurden bisher vor allem geprägte Gene, aber auch einige wichtige Spermatogenesegene untersucht. Diese Untersuchungen wurden vor allem an oligozoospermen Patienten, aber auch an Patienten mit veränderter Protamin-Ratio, Asthenozoospermie, OAT-Syndrom oder idiopathischer Infertilität durchgeführt [12, 28, 53, 54, 57-65, 145]. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen Hypomethylierung von *ALU* repetitiven Elementen und wiederholten Schwangerschaftsverlusten

hergestellt werden, ebenso wie gezeigt werden konnte, dass Epimutationen über die paternale Spermien-DNA auf den Nachwuchs übertragen werden kann [63, 64]. Für die hier untersuchten Gene *hGTL2*, *hPEG3*, *hNANOG* und *hOCT4* waren die epigenetischen Unterschiede zwischen normalen und OAT-Spermien jedoch noch nicht näher untersucht worden, ebenso wie in den meisten bisher durchgeführten Studien der ART-Ausgang nicht berücksichtigt wird. Uns standen jedoch diese Informationen zur Verfügung, so dass der Zusammenhang hier näher beleuchtet werden konnte. Des Weiteren wurden in bisherigen Studien, im Gegensatz zu den hier durchgeführten Untersuchungen, keine Einzelspermien auf ihre Heterogenität hin untersucht, sondern nur Mittelwerte vieler Spermien ermittelt.

4.1 DNA-Methylierung geprägter Gene in IMSI-selektierten Spermien und der Einfluss von Spermienkopfvakuolen

Da für ICSI die Schwangerschaftsrate je Embryotransfer nur bei 30% liegt, war man bemüht eine Methodik zur besseren Spermien Selektion für ART zu entwickeln. Somit wurde die MSOME (motile sperm organelle morphology examination) und daraus resultierend die IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) entwickelt [84]. Zunächst wurde berichtet, dass mittels IMSI bessere Schwangerschafts- und Geburtsraten und damit einhergehend geringere Abortraten erreicht würden, im Vergleich zu konventioneller ICSI [84, 99-101]. Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2013 zur Bewertung von IMSI und ICSI konnte jedoch keinen Unterschied feststellen [43].

Wegen höherer verwendeter mikroskopischer Vergrößerung können bei IMSI, im Gegensatz zur ICSI, in Spermienköpfen Vakuolen detektiert werden [84, 85]. Diese Vakuolen finden sich in morphologisch normalen Spermien sowohl fertiler als auch infertiler Männer [87, 88]. Herkunft und Entstehung der Vakuolen sind bisher unbekannt [86]. LNVs jedoch sind selten [87, 90]. Die Zunahme der Vakuolengröße steht in Verbindung zur Abnahme von Spermienkonzentration, Vitalität, progressiver Motilität und normaler Morphologie [88]. Spermien mit LNVs zeigen Akrosomabnormalitäten wie abnorme Morphologie, Dysfunktion oder gar fehlende Akrosomfunktion [96, 171]. Verschiedenen Studien zu LNV-tragenden Spermien zeigten Chromatinkom-

paktionsabnormalitäten wie abnorme Dekondensierung und Chromatinunreife [93-96]. Hinsichtlich der Frage, ob LNVs zu einer Zunahme von DNA-Fragmentierung führen, sind die Ergebnisse bisheriger Studien widersprüchlich [87, 93, 95, 97].

Bisher wurde nicht untersucht, ob sich IMSI-selektierte Spermien von nach konventionellen ICSI-Kriterien selektierten Spermien hinsichtlich ihrer Häufigkeit von Epimutationen unterscheiden. Da Spermienkopfvakuolen nachweislich Einfluss auf die Chromatinorganisation nehmen können, sollte ebenso deren potentieller epigenetischer Einfluss auf die DNA-Methylierung näher untersucht werden, da solche Veränderungen einen Einfluss auf die Embryonalentwicklung und den ART-Ausgang nehmen könnten. Aus diesem Grunde ist es von enormer Bedeutung nicht nur das morphologisch beste Spermium zu selektieren, sondern auch das epigenetisch beste Spermium.

Dazu wurden hier vier verschiedene Spermengruppen mittels der LD-Technik zur Einzelallelanalyse und anschließender Pyrosequenzierung auf Epimutationen hin untersucht. Um auszuschließen, dass eine zugrunde liegende Infertilität Einfluss nehmen könnte auf die DNA-Methylierungsmuster der untersuchten geprägten Gene *hGTL2* (paternal methyliert), *hLIT1* und *hPEG3* (beide paternal exprimiert), stammten die analysierten Spermien alle von nachweislich fertilen Donoren. Die Spermiengruppe IMSI+/+ war nach IMSI-Kriterien selektiert worden, wobei die Spermien morphologisch normal waren und keine Vakuole im Spermienkopf trugen. Die Gruppe IMSI- war ebenfalls nach IMSI-Kriterien bewertet worden, morphologisch normal, enthielt aber im Gegensatz zur IMSI+/+ Gruppe eine Vakuole im Spermienkopf. Bei der IMSI-/- Gruppe handelte es sich um Spermien, die ebenfalls bei 6000x mikroskopischer Vergrößerung selektiert wurden, aber eine abnorme Morphologie sowie eine Vakuole zeigten. Die Spermien der ICSI Gruppe wurden nach konventionellen ICSI-Kriterien bei einer mikroskopischen Vergrößerung von 400x selektiert, zeigten keine morphologischen Abnormalitäten, könnten aber eine Vakuole getragen haben, da diese bei geringer Vergrößerung (400x) nicht erkannt werden können.

Zunächst wurde ein Assay für die hier untersuchten geprägten Gene etabliert. Für den Großteil der untersuchten Spermien wurden Amplifikate erhalten und teils konnte mehr als nur ein Gen vom selben Spermium amplifiziert werden. Die verschiedenen Gene zeigten unterschiedliche Amplifikationseffizienzen. Unter Berücksichtigung der Tatsachen, dass hier zum einen mit einer sehr geringen Zellzahl (11 Spermien je

Probe) und dementsprechend einer geringen DNA-Ausgangsmenge gearbeitet wurde und dass zum anderen durch die, für die Methylierungsanalyse notwendige, Bisulfitkonvertierung die DNA sehr stark degradiert war, wurde mit dem hier etablierten Assay eine sehr gute Ausbeute erreicht.

Insgesamt wurden in allen untersuchten Spermengruppen nur wenige Epimutationen gefunden. Für Spermien, für die mehrere Gene amplifiziert wurden, zeigte sich abnorme Methylierung nur in je einem der untersuchten Gene. Die IMSI+/+ Gruppe wies ebenso viele Epimutationen auf wie alle anderen nicht-(IMSI+/+)-Gruppen (IMSI-, IMSI-/-, ICSI) zusammengefasst. Ein statistischer Unterschied konnte nicht gefunden werden. Auch der Vergleich der IMSI+/+ Gruppe mit den einzelnen nicht-(IMSI+/+)-Gruppen zeigte keine Unterschiede. Dies wurde sowohl für jedes einzelne untersuchte Gen als auch für alle untersuchten Gene zusammen überprüft.

Zusätzlich wurde analysiert, ob eine der untersuchten Gruppen eine erhöhte CpG-Fehler-Rate zeigte. Die paternal exprimierten Gene *hLIT1* und *hPEG3* zeigten sehr wenige CpG-Fehler, während für das paternal reprimierte Gen *hGTL2* deutlich mehr CpG-Fehler-Allele identifiziert wurden. Dies wurde in allen untersuchten Spermengruppen beobachtet. Spermien mit Amplifikaten mehrerer Gene zeigten nur für eines der Gene ein CpG-Fehler-Allel. Gruppenunterschiede konnten nicht festgestellt werden, weder im Vergleich der Anzahl betroffener Allele, noch im Vergleich der CpG-Fehler-Raten. Dabei wurde wieder die IMSI+/+ Gruppe mit allen nicht-(IMSI+/+)-Gruppen verglichen sowie IMSI+/+ gegen jede einzelne nicht-(IMSI+/+)-Gruppe. Verglichen wurden wieder jedes Gen einzeln und alle Gene zusammengefasst.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich nun zum einen, dass mit IMSI-Kriterien keine besseren Spermien selektiert werden als mit konventionellen ICSI-Kriterien, da kein Unterschied zwischen der IMSI+/+ und ICSI Gruppe festgestellt werden konnte hinsichtlich der Häufigkeit von Epimutationen und CpG-Fehlern. Zum anderen zeigt sich, dass das Vorhandensein von Vakuolen im Spermienkopf wohl keinen Einfluss auf den epigenetischen Zustand des Spermiums hat. Beim Vergleich von IMSI+/+ Spermien ohne Vakuolen mit Spermien mit Vakuole (IMSI-), konnte kein Unterschied im Auftreten abnorm methylierter Allele oder CpG-Fehlern festgestellt werden. Auch abnorme Morphologie zusammen mit Vakuolen (IMSI-/-) beeinflusst nicht die Häufigkeit von Epimutationen oder CpG-Fehlern. Allerdings beschränken sich diese Be-

obachtungen auf die drei hier untersuchten Gene. Es ist nicht auszuschließen, dass andere Gene mehr Epimutationen aufweisen könnten.

Die einzige beobachtete Auffälligkeit war, dass *hGTL2* deutlich mehr CpG-Fehler zeigte als *hLIT1* und *hPEG3*. Dieser Unterschied war in allen Gruppen, mit Ausnahme der IMSI-/- Gruppe, statistisch signifikant. Dass für die IMSI-/- Gruppe keine Signifikanz erreicht wurde, lag wahrscheinlich an der geringen zur Auswertung verfügbaren Anzahl an Allelen. Alle nicht-(IMSI+/+)-Gruppen zusammengefasst zeigten einen Unterschied zwischen *hGTL2* und den anderen Genen. Auch alle insgesamt analysierten Spermengruppen zusammengefasst zeigten diesen Unterschied. Das Gen *hGTL2* scheint demnach fehleranfälliger als die anderen hier untersuchten Gene zu sein. Tatsächlich ist eine Relaxation der Methylierung der IG-DMR für *hGTL2* in verschiedenen Geweben ab dem 2-Zell-Embryonalstadium bekannt [27]. Solange nur einige wenige CpGs betroffen sind, die parentale Prägung aber insgesamt erhalten bleibt, sollten auch in Gameten solche CpG-Fehler keine großen biologischen Auswirkungen zeigen. Von Bedeutung ist letztlich, dass das Gen insgesamt reprimiert bleibt und die parentale Herkunft des Allels im Embryo erkannt werden kann, was durch einen oder wenige CpG-Fehler nicht beeinträchtigt werden sollte.

4.2 Einfluss von IVM auf die Imprint-Etablierung in humanen Oocyten

IVM ist für Frauen von Vorteil, die ein erhöhtes Risiko haben OHSS zu entwickeln. Dabei wird die zu behandelnde Frau keiner hormonellen Stimulation unterzogen, sondern ihr werden COCs mit unreifen Oocyten des GV-Stadiums entnommen und anschließend in einer *In-vitro*-Kultur gereift [44, 45, 70, 82]. Somit kann die systemische Überreaktion, die bei OHSS auftritt, verhindert werden. OHSS ist zwar eine selten auftretende Komplikation, allerdings durchaus ernst zu nehmen, da sie schlimmstenfalls tödlich verlaufen kann [42, 69, 70]. Insbesondere Frauen mit PCOS entwickeln OHSS [45, 69, 70]. Zusätzlich bietet IVM, neben der Verhinderung von OHSS, die Vorteile geringerer Belastung sowie geringerer Kosten [44, 82, 83].

PCOS ist eine endokrine Störung und Ursache für Anovulation und Infertilität. Betroffen sind davon 5 bis 10% aller Frauen im reproduktiven Alter [73-79]. Die Ursache ist hauptsächlich eine gesteigerte Androgensynthese und Sekretion [68, 74, 80]. Gestör-

te Follikelreifung, Ovulation, Fehlgeburten oder fehlregulierte reproduktive Hormone bewirken eine Reduktion der Fertilität [68, 73, 77]. Daneben zeigen PCOS-Patientinnen weitere metabolische Störungen, unter anderem Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes Typ 2 [73, 74, 80].

Wie bereits erläutert wurde, findet die Imprint-Etablierung in Oocyten während der Meiose statt [163]. Die Zunahme der Expression der verschiedenen DNMTs (3A, 3L und 1o) sowie der Methylierung korrelieren dabei mit den Wachstumsphasen der Oocyte [23, 30, 32]. Während des Oocytenwachstums und der Imprint-Etablierung erfolgt auch die IVM [104]. Ob IVM einen Einfluss auf die Imprint-Etablierung hat, ist nicht abschließend geklärt. Tiermodelle und Untersuchungen zum Gesundheitszustand von IVM-Kindern sind bisher sehr positiv, allerdings wurden weltweit erst etwa 3000 IVM-Kinder geboren [44, 83, 116, 121]. Um dieser Frage näher nachzugehen, ob IVM einen epigenetischen Einfluss hat und zu einer Erhöhung von Epimutationen führen könnte, wurden in dieser Arbeit humane IVM-Oocyten von PCOS-Patientinnen mit *in vivo* gereiften Oocyten aus PCOS-Patientinnen verglichen. Da beide Oocytengruppen aus PCOS-Patientinnen stammten, kann eine Verzerrung der Daten durch die Krankheit selbst ausgeschlossen werden, so dass ein womöglich auftretender Unterschied zwischen IVM und *in vivo* Oocyten nur durch die unterschiedlichen Arten der Oocytenreifung begründet werden kann.

Um Epimutationen sicher detektieren zu können, wurden die Oocyten wieder mittels LD und Pyrosequenzierung untersucht. Die Oocyten lagen als Einzelzellen vor. Da sie noch den Polkörper enthielten, konnte für jede Oocyte ein theoretisches Maximum von 4 Allelen amplifiziert werden, was jedoch aufgrund der bisulfitkonvertierungsbedingten DNA-Degradierung selten möglich war. Von besonderer Bedeutung ist bei diesen Untersuchungen die Reinheit der zu untersuchenden Proben. Da Oocyten von Cumuluszellen umgeben sind, müssen diese vor der Analyse vollständig entfernt werden, da somatische Methylierungsmuster aus Cumuluszellen ansonsten fälschlicherweise als Epimutationen der Oocyte gedeutet werden könnten. Deshalb wurden die Oocyten sorgsam aufgereinigt und zusätzlich enthielt der hier etablierte Oocyten-Assay die Gene *hDNMT3Lo*, *hNANOG* und *hOCT4*, welche in Oocyten unmethyliert aber in somatischen Zellen methyliert vorliegen, was wiederum ermöglichte kontaminierte Proben zu erkennen und von der Analyse auszuschließen. Bisherige Studien zum epigenetischen Einfluss von IVM verwendeten Oocyten ge-

ringer Qualität, welche nachdem sie auf die standardmäßig angewandte Hormonstimulation nicht angesprochen hatten, einer sogenannten „rescue“-IVM unterzogen wurden [116]. Außerdem ist unklar wieviel Wert in diesen Studien auf die vollständige Entfernung aller kontaminierenden somatischen Zellen gelegt wurde. Markergene für somatische Kontamination, wie sie in dem hier etablierten Oocyten-Assay verwendet wurden, kamen in anderen IVM-Oocyten-Studien nicht zum Einsatz. Aus der Tatsache heraus, dass die bisher untersuchten Oocyten von geringer Qualität waren und eine somatische Kontamination nicht sicher ausgeschlossen werden kann, erklärt sich das bisherige Studien zum Einfluss von IVM auf Epimutationen widersprüchliche Ergebnisse lieferten, wobei einerseits IVM-bedingte Methylierungsänderungen gefunden wurden [122, 123], aber andere Studien solche Veränderungen nicht bestätigten [116, 124, 125]. Die hier untersuchten IVM-Oocyten waren von besserer Qualität als in anderen Studien, da sie einer „genuine“ (echten) IVM unterzogen wurden d. h. sie wurden im unreifen Zustand entnommen und dann erst *in vitro* gereift und hatten nicht schon *in vivo* einer hormonellen Stimulation unterlegen, wie es sonst bei einer „rescue“-IVM der Fall ist.

Untersucht wurden hier vier geprägte Gene: *hGTL2*, *hLIT1*, *hPEG3* und *hSNRPN*. Die Gene *hLIT1* und *hSNRPN* sind assoziiert mit den Imprint-Erkrankungen BWS bzw. AS [109]. Des Weiteren wurden in „rescue“-IVM-Oocyten veränderte *hLIT1*-Methylierungsmuster gefunden [123]. Auch für *hGTL2* wurden in „rescue“-IVM-Oocyten veränderte Methylierungsmuster beschrieben [122]. Deshalb war es von Interesse, ob sich diese Beobachtungen in den hier untersuchten IVM-Oocyten bestätigen würden. In Maus-Blastozysten, welche von superovulierten Oocyten stammten, wurde für *Peg3* ein Verlust des Imprintings gefunden [117]. Da Superovulation zu veränderten Imprints führen kann, sollte dies hier auch für IVM untersucht werden.

Für die meisten der untersuchten Oocyten wurde Amplifikate erhalten und konnten zur Auswertung herangezogen werden. Außerdem konnten für den Großteil der Oocyten wenigsten 3 der insgesamt 7 untersuchten Gene amplifiziert werden, wobei meistens sowohl geprägte Gene als auch nicht geprägte Markergene untersucht werden konnten. Auch hier zeigten die verschiedenen Gene unterschiedliche Amplifikationseffizienzen, wie es schon bei LD-analysierten Spermien beobachtet wurde. Insgesamt lieferte der hier etablierte Assay sehr gute Ergebnisse, unter Berücksichtigung, dass hier Einzelzellen untersucht wurden, deren DNA stark degradiert war.

Insgesamt wurden in IVM-Oocyten und in *in vivo* gereiften Oocyten nur wenige abnorm methylierte Allele gefunden. In der IVM-Gruppe wurden nur für geprägte Gene Epimutationen detektiert, während in der *In-vivo*-Gruppe auch für die Pluripotenzgene je ein abnorm methyliertes Allel identifiziert wurde. Für *hDNMT3Lo* konnten keine Epimutationen detektiert werden. Nur für eine einzige Oocyte wurden 2 abnorm methylierte Allele für 2 verschiedene Gene in derselben Oocyte gefunden. Alle anderen Oocyten zeigten, wenn überhaupt, je Oocyte nur ein einziges abnormes Allel. Hinsichtlich der Häufigkeit abnormer Methylierung konnte kein Unterschied zwischen IVM- und *in vivo* gereiften Oocyten gefunden werden. Verglichen wurde die Anzahl abnorm methylierter Allele wie auch die Anzahl an Oocyten mit abnorm methylierten Allelen. Beide Analyseansätze zeigten keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Verglichen wurden die Gene einzeln, alle nicht geprägten bzw. geprägten Gene zusammengefasst und alle insgesamt analysierten Gene zusammengefasst.

CpG-Fehler-Allele konnten in beiden Gruppen für alle untersuchten Gene gefunden werden. Für die Häufigkeit von CpG-Fehlern gab es keinen Unterschied zwischen IVM- und *In-vivo*-Oocyten. Dafür wurden die Anzahl der CpG-Fehler-Allele, die Anzahl an Oocyten mit CpG-Fehler-Allelen sowie die CpG-Fehler-Rate verglichen. Auch hier wurde wieder jedes Gen einzeln untersucht, alle nicht geprägten bzw. geprägten Gene zusammengefasst und alle Gene insgesamt. Einzig für *hSNRPN* traten in der *In-vivo*-Gruppe mehr CpG-Fehler auf, sowohl in der Anzahl der Allele wie auch in der Anzahl betroffener Oocyten. Allerdings war die Anzahl der hier für *hSNRPN* analysierten Oocyten zu gering, als das man annehmen könnte, dass die erhaltene Signifikanz biologisch bedeutsam wäre. Bei der Berechnung der CpG-Fehler-Rate konnte für *hSNRPN* keine signifikante Erhöhung der CpG-Fehler in *In-vivo*-Oocyten im Vergleich zu IVM-Oocyten bestätigt werden.

Alle diese verschiedenen Analyseansätze zeigten keinen statistischen Unterschied zwischen IVM-Oocyten und *in vivo* gereiften Oocyten. Dies bedeutet, dass IVM, zumindest für die hier untersuchten Gene, keinen Einfluss auf den Methylierungsstatus von Oocyten auszuüben scheint.

Auffällig war, dass Epimutationen und CpG-Fehler scheinbar vermehrt in unreifen Oocyten detektiert wurden. Dies wurde sowohl in IVM-Oocyten als auch in *in vivo* gereiften Oocyten beobachtet. Deshalb wurde getestet, ob es einen Unterschied zwischen unreifen und reifen Oocyten gäbe. Dabei wurden die jeweiligen Oocyten-

Gruppen einzeln getestet, wie auch beide Gruppen zusammen. Verglichen wurden wieder die Allelzahl, wie auch die Anzahl betroffener Oocyten. Ebenso wurde die CpG-Fehler-Rate verglichen. Auch hier wurden die Gene einzeln verglichen als auch die verschiedenen Gengruppen und die Ergebnisse aller analysierten Gene zusammen. Ein Unterschied zwischen unreifen und reifen Oocyten konnte jedoch weder hinsichtlich der Häufigkeit von Epimutationen noch in Hinblick auf CpG-Fehler gefunden werden. Dass hier kein statistischer Unterschied nachweisbar war, könnte in der insgesamt eher geringen Anzahl analysierter Oocyten begründet sein.

Beim Vergleich der verschiedenen Gene hinsichtlich ihrer CpG-Fehler-Rate fiel auf, dass vor allem *hOCT4*, aber teils auch *hNANOG*, mehr CpG-Fehler zeigten als die anderen Gene. Hauptsächlich zeigte sich dieser Unterschied in der IVM-Gruppe für *hOCT4* im Vergleich zu den anderen Genen. Allerdings wurden beim Vergleich von *hOCT4* bzw. *hNANOG* mit *hDNMT3Lo* auch in der *In-vivo*-Gruppe Unterschiede festgestellt. Dass in der IVM-Gruppe öfter signifikante p-Werte erreicht wurden, könnte an der insgesamt größeren Anzahl analysierter Oocyten liegen. Da beim Vergleich von IVM und *In-vivo*-Oocyten kein Gruppenunterschied festgestellt wurde, ist die erhöhte CpG-Fehler-Rate nicht durch IVM bedingt. Vermutlich ist die Aufrechterhaltung der korrekten Methylierung in Pluripotenzgenen nicht so bedeutsam wie die Imprint-Aufrechterhaltung geprägter Gene, da Pluripotenzgene direkt nach der Befruchtung der Demethylierungswelle epigenetischer Reprogrammierung unterliegen, während die Imprints geprägter Gene vor Demethylierung geschützt sind. Man kann davon ausgehen, dass einzelne CpG-Fehler biologisch weniger bedeutsam sind, solange insgesamt der Methylierungsstatus und der damit einhergehende Funktionsstatus (Expression bzw. Repression) eines Gens erhalten bleibt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Imprint-Etablierung wohl schon vor Entnahme der Oocyten weitestgehend abgeschlossen ist, oder dass deren Etablierung nicht durch IVM negativ beeinflusst wird. CpG-Fehler könnten zumindest in unreifen Oocyten teils dadurch erklärt werden, dass die Imprint-Etablierung eventuell noch nicht vollständig abgeschlossen war. Ein störender Einfluss der IVM auf die Imprint-Etablierung hätte sich in einer erhöhten Anzahl abnormer Allele in IVM-Oocyten geäußert. Da dies jedoch nicht beobachtet werden konnte, im Vergleich zu *in vivo* gereiften Oocyten, scheint IVM keinen Einfluss auf die hier untersuchten Imprints zu

haben. Auch die Aufrechterhaltung von Imprints scheint nicht gestört zu sein, da reife IVM-Oocyten fast ausschließlich korrekte Methylierungsmuster zeigten.

Die Besonderheit der hier durchgeführten Untersuchung liegt darin, dass im Gegensatz zu bisherigen Studien nicht nur bei der Probensammlung sorgsam darauf geachtet wurde alle somatischen Cumuluszellen zu entfernen, sondern dass auch der Assay selbst eine interne Kontrolle enthielt, um somatische Kontamination detektieren und ausschließen zu können. Des Weiteren wurden die Oocyten einzeln untersucht, im Gegensatz zu anderen Studien in denen die Oocyten gepoolt wurden [122, 123]. Bei gepoolten Proben kann schon ein einziges somatisches DNA-Molekül die gesamte Probe kontaminieren und in der anschließenden Analyse fälschlicherweise als Epimutation interpretiert werden. Auffällig ist, dass solche Studien die ihre Proben poolten, Epimutationen fanden die sie als IVM-bedingt interpretierten und des Weiteren erklärten, dass die Imprint-Etablierung im GV-Stadium noch nicht abgeschlossen ist [122, 123]. Andere Studien, in denen Oocyten auf Einzelzellbasis untersucht wurden, konnten keine IVM-bedingten epigenetischen Veränderungen finden und bereits im GV-Stadium korrekte Methylierungsmuster detektieren [124, 125], übereinstimmend mit den hier gemachten Beobachtungen. Außerdem wurden in bisherigen Studien Oocyten geringer Qualität verwendet, die einer „rescue“-IVM unterzogen wurden [122, 123, 125]. Diese Oocyten hatten also wegen unbekannter Ursachen zunächst nicht auf die standardmäßig durchgeführte hormonelle Langzeitstimulation mit FSH und hCG reagiert und wurden anschließend nochmal einer IVM unterzogen, um dann erst epigenetisch untersucht zu werden. Dass diese Oocyten wahrscheinlich schon irgendwelche nicht näher bekannten Defekte in sich trugen, scheint logisch, da sie ansonsten schon mit einer normalen Reifung auf die vor der IVM durchgeführte Hormonstimulation hätten reagieren müssen. Dieses Material ist dementsprechend weniger geeignet, um verlässliche Aussagen zum Einfluss von IVM auf die Imprint-Etablierung erhalten zu können. Der Vorteil der hier untersuchten Oocyten besteht darin, dass die Oocyten vor IVM keiner hormonellen Stimulation unterlagen, die eventuell ebenfalls einen Einflussfaktor für Epimutationen darstellen könnte, sondern unreif entnommen und einer „genuine“ (echten) IVM unterzogen wurden. Der einzige potentielle Einflussfaktor war demnach lediglich die IVM selbst. Doch auch wenn die hier durchgeführte Untersuchung von IVM-Oocyten aussagekräftiger ist als bisherige Studien, sind weitere Untersuchungen zum Einfluss von IVM auf die Oocytenentwicklung sowie auf die Gesundheit der so generierten Nachkommenschaft unerlässlich.

4.3 Deep Bisulfite Sequenzierung normaler und OAT-Spermien mit Hinblick auf den ART-Ausgang

Da mithilfe der LD-Technik nur eine geringe Probenanzahl untersucht werden kann, aufgrund des Arbeits- und Zeitaufwandes, kam im dritten Projekt die NGS-Methode DBS zum Einsatz. Mithilfe von DBS kann ebenfalls bisulfitkonvertierte DNA zur Untersuchung von Epimutationen eingesetzt werden und aufgrund der klonalen Amplifizierung in der emPCR können vielfache klonale Kopien einzelner Allele untersucht werden. Durch die Verwendung probenspezifischer MIDs können gleichzeitig verschiedene Proben analysiert werden. Da im Gegensatz zur Pyrosequenzierung am GS Junior Sequenzierer keine zu sequenzierende genspezifische Sequenz vorgegeben wird, können außerdem Amplikons verschiedener Gene gleichzeitig sequenziert werden. Hierzu wurden DBS-Assays für vier verschiedene Gene, zwei Pluripotenzgene (*hOCT4* und *hNANOG*) und zwei geprägte Gene (*hGTL2* und *hPEG3*), etabliert. Diese basierten auf den bereits in den LD-Experimenten an Spermien und Oocyten eingesetzten Pyrosequenzierungsassays, um mittels DBS dieselben Genabschnitte und damit CpGs sequenzieren zu können, wie sie bei uns in der Arbeitsgruppe bereits mittels Pyrosequenzierung untersucht wurden und werden.

Untersucht wurden insgesamt 54 Spermienproben von Patienten die am Kinderwunschzentrum Wiesbaden in Behandlung waren. Die Hälfte der Proben wies dabei die für ein normales Spermioogramm typischen Parameterwerte auf, entsprechend der WHO-Richtlinien von 2010 [46], während für die andere Hälfte OAT festgestellt worden war. Jede dieser beiden Gruppen war zusätzlich unterteilt in eine Subgruppe, für die die ART-Behandlung in einer Lebendgeburt resultiert hatte (je 13 Proben), und eine Subgruppe, in der trotz ART-Behandlung keine Schwangerschaft etabliert werden konnte (je 14 Proben).

Anhand dieser Proben sollte untersucht werden, inwieweit sich Spermien mit normalen Parametern von solchen aus OAT-Patienten in Hinblick auf die Häufigkeit von Epimutationen oder CpG-Fehlern unterscheiden würden. Des Weiteren war es von Interesse, ob man anhand dieser Proben einen Unterschied sehen würde hinsichtlich des ART-Ausgangs, d. h. ob sich solche Spermienproben, die in einer Lebendgeburt resultierten, epigenetisch von solchen unterscheiden würden, mit denen keine Schwangerschaft etabliert werden konnte.

Auch bei den DBS-Experimenten konnte festgestellt werden, wie schon bei den LD-Experimenten, dass sich unterschiedliche Gene verschieden gut amplifizieren und sequenzieren lassen. Die besten Ergebnisse, d. h. eine hohe Anzahl analysierbarer Reads, wurden für die geprägten Gene *hPEG3* und *hGTL2* erhalten, während die Pluripotenzgene *hNANOG* und *hOCT4* schwieriger zu analysieren waren.

Um zu testen wie zuverlässig DBS ist, wurden in einem ersten Experiment Triplets untersucht. Auch wenn für die Triplets unterschiedlich viele Reads, also Allele, sequenziert wurden, waren die Prozentanteile normal, intermediär oder abnorm methylierter Allele innerhalb ein und derselben Probe alle sehr ähnlich. Es zeigte sich, dass wenn eine Probe eine hohe Anzahl abnormer Methylierungsmuster aufwies, diese unabhängig davon detektiert wurden, ob viele oder nur wenige Reads erhalten wurden. Demnach ist die DBS-Methode damit stabil und zuverlässig.

Insgesamt wurden in den verschiedenen Spermiengruppen nur wenige abnorm methylierte Allele gefunden. Die anderen analysierten Reads waren entweder vollständig normal methyliert oder zeigten ein intermediäres Methylierungsmuster, d. h. dass sie mehr als einen CpG-Fehler aufwiesen, das Allel aber insgesamt normal methyliert war. Die meisten abnormen Allele wurden jeweils in der OK-Gruppe (OAT, keine Schwangerschaft) gefunden. Die OL-Gruppe (OAT, Lebendgeburt) unterschied sich hingegen nicht von den beiden normalen Spermiengruppen. Die wenigsten abnorm methylierten Allele wurden in geprägten Genen gefunden, während die Pluripotenzgene in allen Spermiengruppen mehr abnorm methylierte Allele zeigten. Die statistische Untersuchung bestätigte, dass die OK-Gruppe für *hGTL2* signifikant mehr abnorme Allele aufwies. Auch der Vergleich der Gruppen NL (normal, Lebendgeburt) und NK (normal, keine Schwangerschaft) zeigte hier einen Unterschied, ebenso wie der Vergleich von Lebendgeburtsproben (NL und OL) gegen Proben ohne Schwangerschaft (NK und OK). In geringerem Maße zeigten sich auch für *hPEG3* Unterschiede in der OK-Gruppe im Vergleich zu den anderen Spermiengruppen. Außerdem wies die OK-Gruppe, im Gegensatz zu den anderen Gruppen, oftmals für mehr als nur eines der vier untersuchten Gene erhöhte Abnormalität auf, auch in den geprägten Genen. Die Spermiengruppen ohne Schwangerschaft zeigten für deutlich mehr Proben erhöhte Abnormalität für wenigstens eines der untersuchten Gene (NK: 9/14 Proben, OK: 10/14 Proben) als Spermiengruppen mit Lebendgeburt.

Zusammenfassend zeichnet sich ab, dass Spermien die besonders viele Epimutationen in geprägten Genen trugen, insbesondere für *hGTL2*, nicht fähig waren eine Schwangerschaft zu generieren. Für *hGTL2* ist zwar bekannt, dass es in verschiedenen Geweben eine Relaxation der Aufrechterhaltung des Imprints gibt und intermediäre Methylierung zunimmt, aber diese Relaxation wurde erst ab dem 2-Zell-Stadium der Embryonalentwicklung beobachtet [27]. Im Gegensatz zur Imprint-Relaxation nach der Befruchtung können in Gameten eine Relaxation und damit einhergehende Epimutationen nicht toleriert werden. An den Embryo muss die korrekte Information zur parentalen Herkunft der Allele übermittelt werden, da ansonsten durch die epimutationsbedingte falsche Expression oder Repression geprägter Gene normale Entwicklungsprozesse gestört werden. Demzufolge ist es nur logisch, dass Zygoten, die Epimutationen erben, sich nicht normal entwickeln und Spermien mit vielen Epimutationen zu keiner normalen Schwangerschaft führen können.

Für die Pluripotenzgene konnte für *hNANOG* kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Für *hOCT4* zeigte sich zwischen der NL- und OK-Gruppe kein Unterschied, da auch in der NL-Gruppe bis zu 8,09% Abnormalität gefunden wurde. Zwischen OK-Gruppe und NK- bzw. OL-Gruppe konnten jedoch Unterschiede in der Häufigkeit von Epimutationen festgestellt werden, wobei die OK-Gruppe wieder deutlich mehr abnorme Allele aufwies. Für den Vergleich von Lebendgeburtspuren und Proben ohne Schwangerschaft wurde beinahe ein signifikanter p-Wert erreicht. Da auch in der NL-Gruppe teils Proben mit erhöhter Abnormalität gefunden wurden, scheint die korrekte Methylierung der Pluripotenzgene jedoch nicht von großer Bedeutung zu sein, insbesondere wenn man berücksichtigt, dass direkt nach der Befruchtung eine Demethylierung dieser Gene erfolgt, wodurch eventuell vom Vater vererbte Methylierungsfehler in den Pluripotenzgenen gelöscht werden können.

Hinsichtlich der Häufigkeit intermediärer Methylierungsmuster war zum einen ein Unterschied zwischen den verschiedenen Genen erkennbar, zum anderen wurden Unterschiede zwischen den verschiedenen Spermengruppen festgestellt.

Die meisten intermediär methylierten Allele wurden für *hGTL2* detektiert, gefolgt von *hOCT4*, *hNANOG* und *hPEG3*. Statistisch sind diese genspezifischen Unterschiede signifikant (p-Wert < 0,0001). Für die Häufigkeit abnorm methylierter Allele konnte kein Unterschied zwischen den Genen gefunden werden. Eine erhöhte Anzahl an CpG-Fehlern für *hGTL2* wurde schon für die LD-analysierten Spermienproben beo-

bachtet und bestätigte sich nun in den DBS-Experimenten. Solch eine Imprint-Relaxation für *hGTL2* ist ab dem 2-Zellstadium der Embryonalentwicklung bekannt, wurde jedoch nicht in Gameten beobachtet, wobei in der Studie von Geuns et al. keine Einzelallelanalyse durchgeführt worden war [27]. Für Pluripotenzgene zeigten auch die LD-analysierten Oocyten mehr CpG-Fehler, ebenso wie die DBS-analysierten Spermien. Vermutlich sind diese CpG-Fehler jedoch nicht weiter bedeutsam, da beide parentalen Genome nach der Befruchtung demethyliert werden. Die korrekte Aufrechterhaltung der Methylierungszustände geprägter Gene in Gameten ist funktionell von größerer Bedeutung als von Genen, die nach der Befruchtung demethyliert werden.

Beim Vergleich der Spermengruppen untereinander zeigten sich für intermediär methylierte *hPEG3*-Allele Unterschiede zwischen der OK-Gruppe und den anderen Spermengruppen. Ein weiterer Unterschied wurde für *hNANOG* zwischen den Gruppen mit normalen Spermien gefunden. Hier zeigte die NK-Gruppe mehr intermediäre Methylierung als die NL-Gruppe. Ein Vergleich zwischen normalen Spermien und OAT-Proben zeigte einen Unterschied für *hPEG3*, bedingt durch die hohe intermediäre Methylierung der OK-Gruppe, während die OL-Gruppe sogar weniger intermediäre Methylierung als die NL-Gruppe aufwies. Beim Vergleich zwischen Lebendgeburtsprouben und Proben ohne Schwangerschaft konnte nur für *hNANOG*, nicht jedoch für *hPEG3*, ein Unterschied gefunden werden. Es zeichnet sich ab, dass Spermien, die zu keiner Schwangerschaft führen, mehr CpG-Fehler tragen, als solche Spermien die zu einer Lebendgeburt führen. Auch wenn einzelne CpG-Fehler biologisch wohl kaum bedeutsam sind, scheint sich hingegen eine Ansammlung dieser Fehler in verschiedenen Genen, vermutlich ab einem gewissen nicht näher bekannten Schwellenwert, negativ auf die Fertilität auszuwirken.

Alles in allem lassen sich die Ergebnisse der DBS-Untersuchung soweit zusammenfassen, dass Spermienproben die zu keiner Schwangerschaft führten, insbesondere für *hGTL2*, deutlich mehr abnorme Methylierung aufwiesen als solche Spermienproben, die zu einer Lebendgeburt führten. Auch intermediäre Methylierung war in Spermienproben ohne Schwangerschaft häufiger als in Spermien mit Lebendgeburt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass über die Häufigkeit abnormer Methylierungswerte für *hGTL2* eine prädiktive Korrelation zum ART-Ausgang besteht.

Es sei nochmals hervorgehoben, dass sich OAT-Spermien die zu einer Lebendgeburt führten epigenetisch, zumindest für die hier untersuchten Gene, nicht von Spermien mit normalen Parametern unterscheiden. Solche OAT-Spermien die zu keiner Schwangerschaft führten, zeigten jedoch insgesamt für alle untersuchten Gene deutlich mehr abnorm methylierte Allele als die anderen Gruppen. Auch für intermediäre Methylierung konnten diese Unterschiede festgestellt werden. Es gibt demnach innerhalb der OAT-Population zwei verschiedene Subpopulationen: epigenetisch normal oder mit gehäuften Epimutationen. Inwieweit OAT hierbei ursächlich ist für die beobachteten Epimutationen, wenn Proben anderer OAT-Patienten epigenetisch normal zu sein scheinen, bedarf noch einer genaueren Klärung.

Methylierungsdefekte verschiedener geprägter Gene, wie z.B. *H19*, *MEST*, *GTL2*, *LIT1*, *PEG3* und *SNRPN*, ebenso wie abnorme Methylierung an Promotoren wichtiger Spermatogenese-Gene, wie *CREM* und *DAZL*, konnten schon in anderen Studien für Spermien von Patienten mit Oligozoospermie, Asthenozoospermie, abnormer Protamin-Ratio, idiopathischer Infertilität oder OAT-Syndrom gezeigt werden [12, 28, 53, 54, 57-65, 145]. Ebenso steht Hypomethylierung *ALU* repetitiver Elemente in Verbindung zu wiederkehrenden Schwangerschaftsverlusten [28, 64]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *H19* und *GTL2*-Epimutationen aus ART-Abortproben auch in der paternalen Spermien-DNA nachweisbar sind und demzufolge direkt vom Vater auf das Kind übertragen werden können [63].

Bisherige Studien sowie die hier durchgeführten Experimente machen deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten bzw. der Häufigkeit von Epimutationen und dem Schwangerschaftsausgang und damit der Infertilität besteht. Dennoch besteht noch viel Klärungsbedarf, insbesondere hinsichtlich der Ursachen von Epimutationen und wie man ein für ART geeignetes Spermium mit möglichst wenig Epimutationen auswählt, um eine Schwangerschaft zu ermöglichen aber gleichzeitig das Risiko der Übertragung von Epimutationen und eventuell dadurch hervorgerufener Imprinting-Erkrankungen zu verringern.

Das gehäufte Auftreten von *hGTL2*-Epimutationen in Spermienproben ohne Schwangerschaft ist insofern interessant, dass *hGTL2* zusammen mit anderen erst noch zu identifizierenden Genen als Markergen dienen könnte. Durch eine epigenetische Analyse einer Spermienprobe könnte man möglicherweise schon vor Durchführungsbeginn einer ART-Behandlung eine Voraussage über deren Erfolg erhalten und

betroffene Paaren besser über die bestehenden Erfolgchancen solch einer Behandlung informieren.

4.4 Ausblick

Die verschiedenen ART-Techniken gewinnen aufgrund zunehmender Infertilität immer mehr an Bedeutung. Damit einhergehend müssen eventuelle Risiken für die Patienten, die sich solch einer ART-Behandlung unterziehen, z. B. OHSS bei PCOS-Frauen, sowie eventuelle Risiken für die so gezeugte Nachkommenschaft, wie die Entstehung von Imprinting-Erkrankungen, weiter aufgeklärt werden.

Von großer Bedeutung ist es, eine Methode zu finden, mit der nicht nur morphologisch normale Spermien selektiert werden können, sondern auch solche Spermien, die epigenetisch am normalsten sind, d. h. die wenigsten Epimutationen tragen. Damit könnte man das Risiko der Übertragung von Epimutationen vom Vater an die Nachkommenschaft verringern und damit einhergehend das Risiko für Imprinting-Erkrankungen reduzieren. Auch wenn sich abzeichnet, dass das mit ART in Zusammenhang gebrachte potentiell erhöhte Risiko für Imprinting-Erkrankungen wohl eher auf die zugrunde liegende Infertilität selbst und weniger auf die Technik per se zurückzuführen ist [108, 113, 163, 166], muss man dennoch bedenken, dass gerade bei der ICSI-Technik, bei der ein einzelnes selektiertes Spermium in die Oocyte injiziert wird, Epimutationen auf den Embryo übertragen werden können, wie es bereits in Aborten nach ART beobachtet wurde [63]. Die Entwicklung der IMSI-Technik war ein solcher Versuch, die Qualität der für ART eingesetzten Spermien zu verbessern. Allerdings wurden epigenetische Faktoren hier außer Acht gelassen und lediglich Wert gelegt auf morphologische Spermien-Charakteristika. In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich vom epigenetischen Standpunkt aus konventionell nach ICSI-Kriterien selektierte Spermien nicht von nach IMSI-Kriterien selektierten Spermien unterscheiden. Da zunehmend erkannt wird, dass die Epigenetik einen großen Einfluss auf die normale Embryogenese hat und dass durch Epimutationen Imprinting-Erkrankungen ausgelöst werden können, müssen hier weitere Bestrebungen erfolgen die in der ART eingesetzten Techniken zu verbessern. Wie in der hier vorgelegten Arbeit anhand der DBS-analysierten Spermienproben außerdem

gezeigt werden konnte, zeigen bestimmte Gene mehr Epimutationen als andere. Da über die Anzahl detektierter Epimutationen eine prädiktive Aussage über den ART-Ausgang getroffen werden kann, ist es nun wichtig weitere solcher Markergene zu identifizieren. Mithilfe dieser Markergene könnte man das Fertilitätspotential von Spermienproben hinsichtlich epigenetischer Faktoren überprüfen, zusätzlich zu den bisher routinemäßig erstellten Spermioogrammen, bei denen bisher nur äußere Kriterien wie Volumen, Morphologie, Motilität und Vitalität bewertet werden. Mit solch einer zusätzlichen Untersuchung, könnten den Patienten bessere Informationen über den potentiellen Ausgang einer ART-Behandlung gegeben werden. Insbesondere im Falle schlechter Prognosen, könnten sich die Patienten emotional besser auf einen Nichterfolg einer ART-Behandlung einstellen und gegebenenfalls z. B. über die Option einer Adoption nachdenken, anstatt sich wiederholt den körperlichen und emotionalen Anstrengungen wiederholter ART-Behandlungen aussetzen zu müssen.

Auch in Hinblick auf die IVM sind weitere Studien notwendig. Bisherige Studien sowie die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen zwar insgesamt, dass die IVM wohl keinen epigenetischen Einfluss auf das maternale Genom und damit auf die Gesundheit der so gezeugten Kinder hat [83, 116, 121], dennoch ist es notwendig auch in Zukunft den Gesundheitszustand solcher Kinder zu verfolgen, da die Aussagekraft bisheriger Studien eher gering ist, bedingt durch die geringe Anzahl an IVM-Kindern.

Insgesamt stellt ART eine gute und alles in allem sichere Möglichkeit dar, Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch zu helfen. Dennoch sind im Interesse der Patienten und ihres Nachwuchses weitere Bestrebungen zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden Prozesse der Infertilität und zur Verbesserung der bisher eingesetzten Techniken unerlässlich.

5 Referenzen

5.1 Literaturnachweis

1. Barlow, D.P., *Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model*. Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 379-403.
2. Boland, M.J., K.L. Nazor, and J.F. Loring, *Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation*. Circ Res, 2014. **115**(2): p. 311-24.
3. Carrell, D.T., *Epigenetics of the male gamete*. Fertil Steril, 2012. **97**(2): p. 267-74.
4. Barlow, D.P. and M.S. Bartolomei, *Genomic imprinting in mammals*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(2).
5. Sasaki, H. and Y. Matsui, *Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 129-40.
6. Reik, W., W. Dean, and J. Walter, *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1089-93.
7. Auclair, G. and M. Weber, *Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals*. Biochimie, 2012. **94**(11): p. 2202-11.
8. Jones, P.A., *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(7): p. 484-92.
9. Trasler, J.M., *Epigenetics in spermatogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **306**(1-2): p. 33-6.
10. Illingworth, R.S. and A.P. Bird, *CpG islands--'a rough guide'*. FEBS Lett, 2009. **583**(11): p. 1713-20.
11. Deaton, A.M. and A. Bird, *CpG islands and the regulation of transcription*. Genes Dev, 2011. **25**(10): p. 1010-22.
12. Boissonnas, C.C., P. Jouannet, and H. Jammes, *Epigenetic disorders and male subfertility*. Fertil Steril, 2013. **99** (3): p. 624-31.
13. Reik, W. and A. Lewis, *Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 403-10.
14. Slotkin, R.K. and R. Martienssen, *Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 272-85.
15. Reik, W., *Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 425-32.
16. Arnaud, P., *Genomic imprinting in germ cells: imprints are under control*. Reproduction, 2010. **140**(3): p. 411-23.
17. Plasschaert, R.N. and M.S. Bartolomei, *Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells*. Development, 2014. **141**(9): p. 1805-13.
18. Haaf, T., *Methylation dynamics in the early mammalian embryo: Implications of genome reprogramming defects for development*. DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer, 2006. **310**: p. 13-22.
19. Abramowitz, L.K. and M.S. Bartolomei, *Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci*. Curr Opin Genet Dev, 2012. **22**(2): p. 72-8.
20. Bartolomei, M.S. and A.C. Ferguson-Smith, *Mammalian genomic imprinting*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
21. Feil, R., *Epigenetic asymmetry in the zygote and mammalian development*. Int J Dev Biol, 2009. **53**(2-3): p. 191-201.
22. Renfree, M.B., S. Suzuki, and T. Kaneko-Ishino, *The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1609): p. 20120151.
23. MacDonald, W.A. and M.R. Mann, *Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation*. Mol Reprod Dev, 2014. **81**(2): p. 126-40.

24. Kelsey, G., *Genomic imprinting--roles and regulation in development*. *Endocr Dev*, 2007. **12**: p. 99-112.
25. Moore, T. and D. Haig, *Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war*. *Trends Genet*, 1991. **7**(2): p. 45-9.
26. Ferguson-Smith, A.C. and M.A. Surani, *Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1086-9.
27. Geuns, E., N. De Temmerman, P. Hilven, A. Van Steirteghem, I. Liebaers, and M. De Rycke, *Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human*. *European Journal of Human Genetics*, 2007. **15**(3): p. 352-361.
28. Jenkins, T.G. and D.T. Carrell, *The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo*. *Reproduction*, 2012. **143**(6): p. 727-34.
29. Gill, M.E., S. Erkek, and A.H. Peters, *Parental epigenetic control of embryogenesis: a balance between inheritance and reprogramming?* *Curr Opin Cell Biol*, 2012. **24**(3): p. 387-96.
30. Tomizawa, S., J. Nowacka-Woszuk, and G. Kelsey, *DNA methylation establishment during oocyte growth: mechanisms and significance*. *Int J Dev Biol*, 2012. **56**(10-12): p. 867-75.
31. Smallwood, S.A. and G. Kelsey, *De novo DNA methylation: a germ cell perspective*. *Trends Genet*, 2012. **28**(1): p. 33-42.
32. Zuccotti, M., V. Merico, S. Cecconi, C.A. Redi, and S. Garagna, *What does it take to make a developmentally competent mammalian egg?* *Hum Reprod Update*, 2011. **17**(4): p. 525-40.
33. Amor, D.J. and J. Halliday, *A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies*. *Hum Reprod*, 2008. **23**(12): p. 2826-2834.
34. Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(8): p. 597-610.
35. Odom, L.N. and J. Segars, *Imprinting disorders and assisted reproductive technology*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2010. **17**(6): p. 517-22.
36. Jacob, K.J., W.P. Robinson, and L. Lefebvre, *Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: opposite developmental imbalances in imprinted regulators of placental function and embryonic growth*. *Clin Genet*, 2013. **84**(4): p. 326-34.
37. Kagami, M., Y. Sekita, G. Nishimura, M. Irie, F. Kato, M. Okada, S. Yamamori, H. Kishimoto, M. Nakayama, Y. Tanaka, K. Matsuoka, T. Takahashi, M. Noguchi, Y. Tanaka, K. Masumoto, T. Utsunomiya, H. Kouzan, Y. Komatsu, H. Ohashi, K. Kurosawa, K. Kosaki, A.C. Ferguson-Smith, F. Ishino, and T. Ogata, *Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes*. *Nat Genet*, 2008. **40**(2): p. 237-42.
38. Kagami, M., M.J. O'Sullivan, A.J. Green, Y. Watabe, O. Arisaka, N. Masawa, K. Matsuoka, M. Fukami, K. Matsubara, F. Kato, A.C. Ferguson-Smith, and T. Ogata, *The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(6): p. e1000992.
39. da Rocha, S.T., C.A. Edwards, M. Ito, T. Ogata, and A.C. Ferguson-Smith, *Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain*. *Trends Genet*, 2008. **24**(6): p. 306-16.
40. Dada, R., M. Kumar, R. Jesudasan, J.L. Fernandez, J. Gosalvez, and A. Agarwal, *Epigenetics and its role in male infertility*. *J Assist Reprod Genet*, 2012. **29**(3): p. 213-23.
41. Mascarenhas, M.N., S.R. Flaxman, T. Boerma, S. Vanderpoel, and G.A. Stevens, *National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys*. *PLoS Med*, 2012. **9**(12): p. e1001356.
42. Zegers-Hochschild, F., G.D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, S. van der Poel, T. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive, and O. World Health, *The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009*. *Hum Reprod*, 2009. **24**(11): p. 2683-7.
43. Teixeira, D.M., M.A. Barbosa, R.A. Ferriani, P.A. Navarro, N. Raine-Fenning, C.O. Nastri, and W.P. Martins, *Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013. **7**: p. CD010167.

44. Kutzt, J., S. Romero, M. De Vos, J. Smits, T. Haaf, and E. Anckaert, *Human in vitro oocyte maturation is not associated with increased imprinting error rates at LIT1, SNRPN, PEG3 and GTL2*. Hum Reprod, 2014. **29**(9): p. 1995-2005.
45. Coticchio, G., M. Dal-Canto, M.C. Guglielmo, M. Mignini-Renzini, and R. Fadini, *Human oocyte maturation in vitro*. Int J Dev Biol, 2012. **56**(10-12): p. 909-18.
46. World Health Organization, W.H.O., *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. WHO press, 2010. **5th Edition**.
47. Hildebrand, M.S., M.R. Avenarius, M. Fellous, Y. Zhang, N.C. Meyer, J. Auer, C. Serres, K. Kahrizi, H. Najmabadi, J.S. Beckmann, and R.J. Smith, *Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels*. Eur J Hum Genet, 2010. **18**(11): p. 1178-84.
48. Singh, K. and D. Jaiswal, *Human male infertility: a complex multifactorial phenotype*. Reprod Sci, 2011. **18**(5): p. 418-25.
49. Guerrero-Bosagna, C. and M.K. Skinner, *Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of male infertility*. Curr Opin Genet Dev, 2014. **26C**: p. 79-88.
50. Esteves, S.C. and A. Agarwal, *Novel concepts in male infertility*. Int Braz J Urol, 2011. **37**(1): p. 5-15.
51. Kee, K., V.T. Angeles, M. Flores, H.N. Nguyen, and R.A. Reijo Pera, *Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation*. Nature, 2009. **462**(7270): p. 222-5.
52. Lin, Y.M., P.L. Kuo, Y.H. Lin, Y.N. Teng, and J.S. Nan Lin, *Messenger RNA transcripts of the meiotic regulator BOULE in the testis of azoospermic men and their application in predicting the success of sperm retrieval*. Hum Reprod, 2005. **20**(3): p. 782-8.
53. Navarro-Costa, P., P. Nogueira, M. Carvalho, F. Leal, I. Cordeiro, C. Calhaz-Jorge, J. Goncalves, and C.E. Plancha, *Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm*. Hum Reprod, 2010. **25**(10): p. 2647-54.
54. Li, B., J.B. Li, X.F. Xiao, Y.F. Ma, J. Wang, X.X. Liang, H.X. Zhao, F. Jiang, Y.Q. Yao, and X.H. Wang, *Altered DNA methylation patterns of the H19 differentially methylated region and the DAZL gene promoter are associated with defective human sperm*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71215.
55. Matzuk, M.M. and D.J. Lamb, *The biology of infertility: research advances and clinical challenges*. Nat Med, 2008. **14**(11): p. 1197-213.
56. Hammoud, S.S., D.A. Nix, A.O. Hammoud, M. Gibson, B.R. Cairns, and D.T. Carrell, *Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men*. Hum Reprod, 2011. **26**(9): p. 2558-69.
57. Hammoud, S.S., J. Purwar, C. Pflueger, B.R. Cairns, and D.T. Carrell, *Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility*. Fertil Steril, 2010. **94**(5): p. 1728-33.
58. Marques, C.J., P. Costa, B. Vaz, F. Carvalho, S. Fernandes, A. Barros, and M. Sousa, *Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia*. Mol Hum Reprod, 2008. **14**(2): p. 67-74.
59. Marques, C.J., F. Carvalho, M. Sousa, and A. Barros, *Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis*. Lancet, 2004. **363**(9422): p. 1700-2.
60. Houshdaran, S., V.K. Cortessis, K. Siegmund, A. Yang, P.W. Laird, and R.Z. Sokol, *Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm*. PLoS One, 2007. **2**(12): p. e1289.
61. Poplinski, A., F. Tuttelmann, D. Kanber, B. Horsthemke, and J. Gromoll, *Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1*. Int J Androl, 2010. **33**(4): p. 642-9.
62. Kobayashi, H., A. Sato, E. Otsu, H. Hiura, C. Tomatsu, T. Utsunomiya, H. Sasaki, N. Yaegashi, and T. Arima, *Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(21): p. 2542-51.

63. Kobayashi, H., H. Hiura, R.M. John, A. Sato, E. Otsu, N. Kobayashi, R. Suzuki, F. Suzuki, C. Hayashi, T. Utsunomiya, N. Yaegashi, and T. Arima, *DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(12): p. 1582-91.
64. El Hajj N, Zechner U, Schneider E, Tresch A, Gromoll J, Hahn T, Schorsch M, and H. T., *Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males*. Sex Dev 2011. **5**(2): p. 60-9.
65. Nanassy, L. and D.T. Carrell, *Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation*. Fertil Steril, 2011. **95**(7): p. 2310-4.
66. American College of, O., P. Gynecologists Committee on Gynecologic, and C. Practice, *Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589*. Fertil Steril, 2014. **101**(3): p. 633-4.
67. Gosden, R. and B. Lee, *Portrait of an oocyte: our obscure origin*. J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 973-83.
68. Desai, S.S., B.S. Roy, and S.D. Mahale, *Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction*. Reproduction, 2013. **146**(6): p. R235-48.
69. Fiedler, K. and D. Ezcurra, *Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment*. Reprod Biol Endocrinol, 2012. **10**: p. 32.
70. Lim, K.S., S.J. Chae, C.W. Choo, Y.H. Ku, H.J. Lee, C.Y. Hur, J.H. Lim, and W.D. Lee, *In vitro maturation: Clinical applications*. Clin Exp Reprod Med, 2013. **40**(4): p. 143-7.
71. Hickey, M., K. Ballard, and C. Farquhar, *Endometriosis*. BMJ, 2014. **348**: p. g1752.
72. Jungheim, E.S., J.L. Travieso, and M.M. Hopeman, *Weighing the impact of obesity on female reproductive function and fertility*. Nutr Rev, 2013. **71 Suppl 1**: p. S3-8.
73. Walters, K.A., C.M. Allan, and D.J. Handelsman, *Rodent models for human polycystic ovary syndrome*. Biol Reprod, 2012. **86**(5): p. 149, 1-12.
74. Alvarez-Blasco, F., J.I. Botella-Carretero, J.L. San Millan, and H.F. Escobar-Morreale, *Prevalence and characteristics of the polycystic ovary syndrome in overweight and obese women*. Arch Intern Med, 2006. **166**(19): p. 2081-6.
75. Teede, H., A. Deeks, and L. Moran, *Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan*. BMC Med, 2010. **8**: p. 41.
76. Fauser, B.C., B.C. Tarlatzis, R.W. Rebar, R.S. Legro, A.H. Balen, R. Lobo, E. Carmina, J. Chang, B.O. Yildiz, J.S. Laven, J. Boivin, F. Petraglia, C.N. Wijeyeratne, R.J. Norman, A. Dunaif, S. Franks, R.A. Wild, D. Dumesic, and K. Barnhart, *Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group*. Fertil Steril, 2012. **97**(1): p. 28-38 e25.
77. Witchel, S.F. and M. Tena-Sempere, *The Kiss1 system and polycystic ovary syndrome: lessons from physiology and putative pathophysiological implications*. Fertil Steril, 2013. **100**(1): p. 12-22.
78. Shang, K., X. Jia, J. Qiao, J. Kang, and Y. Guan, *Endometrial abnormality in women with polycystic ovary syndrome*. Reprod Sci, 2012. **19**(7): p. 674-83.
79. Sirmans, S.M. and K.A. Pate, *Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome*. Clin Epidemiol, 2013. **6**: p. 1-13.
80. Johansson, J. and E. Stener-Victorin, *Polycystic ovary syndrome: effect and mechanisms of acupuncture for ovulation induction*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. **2013**: p. 762615.
81. Lebbe, M. and T.K. Woodruff, *Involvement of androgens in ovarian health and disease*. Mol Hum Reprod, 2013. **19**(12): p. 828-37.
82. Shalom-Paz, E., H. Holzer, W. Son, I. Levin, S.L. Tan, and B. Almog, *PCOS patients can benefit from in vitro maturation (IVM) of oocytes*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012. **165**(1): p. 53-6.

83. Basatemur, E. and A. Sutcliffe, *Health of IVM children*. J Assist Reprod Genet, 2011. **28**(6): p. 489-93.
84. Bartoov, B., A. Berkovitz, and F. Eltes, *Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection*. N Engl J Med, 2001. **345**(14): p. 1067-8.
85. Ubaldi, F. and L. Rienzi, *Morphological selection of gametes*. Placenta, 2008. **29 Suppl B**: p. 115-20.
86. Perdrix, A. and N. Rives, *Motile sperm organelle morphology examination (MSOME) and sperm head vacuoles: state of the art in 2013*. Hum Reprod Update, 2013. **19**(5): p. 527-41.
87. Watanabe, S., A. Tanaka, S. Fujii, H. Mizunuma, A. Fukui, R. Fukuhara, R. Nakamura, K. Yamada, I. Tanaka, S. Awata, and M. Nagayoshi, *An investigation of the potential effect of vacuoles in human sperm on DNA damage using a chromosome assay and the TUNEL assay*. Hum Reprod, 2011. **26**(5): p. 978-86.
88. Perdrix, A., R. Saidi, J.F. Menard, E. Gruel, J.P. Milazzo, B. Mace, and N. Rives, *Relationship between conventional sperm parameters and motile sperm organelle morphology examination (MSOME)*. Int J Androl, 2012. **35**(4): p. 491-8.
89. Thundathil, J., A.T. Palasz, A.D. Barth, and R.J. Mapletoft, *Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles*. Mol Reprod Dev, 1998. **50**(3): p. 328-33.
90. Berkovitz, A., F. Eltes, A. Ellenbogen, S. Peer, D. Feldberg, and B. Bartoov, *Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome?* Hum Reprod, 2006. **21**(7): p. 1787-90.
91. de Almeida Ferreira Braga, D.P., A.S. Setti, R.C. Figueira, M. Nichi, C.D. Martinhago, A. Iaconelli, Jr., and E. Borges, Jr., *Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes*. Urology, 2011. **78**(4): p. 786-91.
92. Silva, L.F., J.B. Oliveira, C.G. Petersen, A.L. Mauri, F.C. Massaro, M. Cavagna, R.L. Baruffi, and J.G. Franco, Jr., *The effects of male age on sperm analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME)*. Reprod Biol Endocrinol, 2012. **10**: p. 19.
93. Franco, J.G., Jr., R.L. Baruffi, A.L. Mauri, C.G. Petersen, J.B. Oliveira, and L. Vagnini, *Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI*. Reprod Biomed Online, 2008. **17**(1): p. 42-5.
94. Franco, J.G., Jr., A.L. Mauri, C.G. Petersen, F.C. Massaro, L.F. Silva, V. Felipe, M. Cavagna, A. Pontes, R.L. Baruffi, J.B. Oliveira, and L.D. Vagnini, *Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa*. Int J Androl, 2012. **35**(1): p. 46-51.
95. Boitrelle, F., F. Ferfour, J.M. Petit, D. Segretain, C. Tourain, M. Bergere, M. Bailly, F. Vialard, M. Albert, and J. Selva, *Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation*. Hum Reprod, 2011. **26**(7): p. 1650-8.
96. Perdrix, A., A. Travers, M.H. Chelli, D. Escalier, J.L. Do Rego, J.P. Milazzo, N. Mousset-Simeon, B. Mace, and N. Rives, *Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles*. Hum Reprod, 2011. **26**(1): p. 47-58.
97. Hammoud, I., F. Boitrelle, F. Ferfour, F. Vialard, M. Bergere, B. Wainer, M. Bailly, M. Albert, and J. Selva, *Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates*. Andrologia, 2013. **45**(3): p. 163-70.
98. Oliveira, J.B., F.C. Massaro, R.L. Baruffi, A.L. Mauri, C.G. Petersen, L.F. Silva, L.D. Vagnini, and J.G. Franco, Jr., *Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage*. Fertil Steril, 2010. **94**(5): p. 1937-40.
99. Bartoov, B., A. Berkovitz, F. Eltes, A. Kogosovsky, A. Yagoda, H. Lederman, S. Artzi, M. Gross, and Y. Barak, *Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected*

- sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection*. Fertil Steril, 2003. **80**(6): p. 1413-9.
100. Berkovitz, A., F. Eltes, S. Yaari, N. Katz, I. Barr, A. Fishman, and B. Bartoov, *The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm*. Hum Reprod, 2005. **20**(1): p. 185-90.
 101. Antinori, M., E. Licata, G. Dani, F. Cerusico, C. Versaci, D. d'Angelo, and S. Antinori, *Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial*. Reprod Biomed Online, 2008. **16**(6): p. 835-41.
 102. Feng, C., S. Tian, Y. Zhang, J. He, X.M. Zhu, D. Zhang, J.Z. Sheng, and H.F. Huang, *General imprinting status is stable in assisted reproduction-conceived offspring*. Fertil Steril, 2011. **96**(6): p. 1417-1423 e9.
 103. Shufaro, Y. and N. Laufer, *Epigenetic concerns in assisted reproduction: update and critical review of the current literature*. Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. 605-6.
 104. Denomme, M.M. and M.R. Mann, *Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during assisted reproductive technologies*. Reproduction, 2012. **144**(4): p. 393-409.
 105. Tierling, S., N.Y. Souren, J. Gries, C. Loporto, M. Groth, P. Lutsik, H. Neitzel, I. Utz-Billing, G. Gillessen-Kaesbach, H. Kentenich, G. Griesinger, K. Sperling, E. Schwinger, and J. Walter, *Assisted reproductive technologies do not enhance the variability of DNA methylation imprints in human*. J Med Genet, 2010. **47**(6): p. 371-6.
 106. El Hajj, N. and T. Haaf, *Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction*. Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. 632-41.
 107. Chiba, H., H. Hiura, H. Okae, N. Miyauchi, F. Sato, A. Sato, and T. Arima, *DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technology*. Pediatr Int, 2013. **55**(5): p. 542-9.
 108. Doornbos, M.E., S.M. Maas, J. McDonnell, J.P. Vermeiden, and R.C. Hennekam, *Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study*. Hum Reprod, 2007. **22**(9): p. 2476-80.
 109. van Montfoort, A.P., L.L. Hanssen, P. de Sutter, S. Viville, J.P. Geraedts, and P. de Boer, *Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance*. Hum Reprod Update, 2012. **18**(2): p. 171-97.
 110. Puumala, S.E., H.H. Nelson, J.A. Ross, R.H. Nguyen, M.A. Damario, and L.G. Spector, *Similar DNA methylation levels in specific imprinting control regions in children conceived with and without assisted reproductive technology: a cross-sectional study*. BMC Pediatr, 2012. **12**: p. 33.
 111. Oliver, V.F., H.L. Miles, W.S. Cutfield, P.L. Hofman, J.L. Ludgate, and I.M. Morison, *Defects in imprinting and genome-wide DNA methylation are not common in the in vitro fertilization population*. Fertil Steril, 2012. **97**(1): p. 147-53 e7.
 112. Bowdin, S., C. Allen, G. Kirby, L. Brueton, M. Afnan, C. Barratt, J. Kirkman-Brown, R. Harrison, E.R. Maher, and W. Reardon, *A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders*. Hum Reprod, 2007. **22**(12): p. 3237-40.
 113. Ludwig, M., A. Katalinic, S. Gross, A. Sutcliffe, R. Varon, and B. Horsthemke, *Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples*. J Med Genet, 2005. **42**(4): p. 289-91.
 114. Vermeiden, J.P. and R.E. Bernardus, *Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection?* Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. 642-51.
 115. Camprubi, C., I. Iglesias-Platas, A. Martin-Trujillo, C. Salvador-Alarcon, M.A. Rodriguez, D.R. Barredo, F. Court, and D. Monk, *Stability of genomic imprinting and gestational-age dynamic methylation in complicated pregnancies conceived following assisted reproductive technologies*. Biol Reprod, 2013. **89**(3): p. 50.
 116. Anckaert, E., M. De Rycke, and J. Smits, *Culture of oocytes and risk of imprinting defects*. Hum Reprod Update, 2013. **19**(1): p. 52-66.

117. Market-Velker, B.A., L.Y. Zhang, L.S. Magri, A.C. Bonvissuto, and M.R.W. Mann, *Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner*. Human Molecular Genetics, 2010. **19**(1): p. 36-51.
118. Fauque, P., *Ovulation induction and epigenetic anomalies*. Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. 616-23.
119. Sato, A., E. Otsu, H. Negishi, T. Utsunomiya, and T. Arima, *Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes*. Hum Reprod, 2007. **22**(1): p. 26-35.
120. Shi, X., S. Chen, H. Zheng, L. Wang, and Y. Wu, *Aberrant DNA methylation of imprinted loci in human in vitro matured oocytes after long agonist stimulation*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013. **167**(1): p. 64-8.
121. Fadini, R., M. Mignini Renzini, T. Guarnieri, M. Dal Canto, E. De Ponti, A. Sutcliffe, M. Shevlin, R. Comi, and G. Coticchio, *Comparison of the obstetric and perinatal outcomes of children conceived from in vitro or in vivo matured oocytes in in vitro maturation treatments with births from conventional ICSI cycles*. Hum Reprod, 2012. **27**(12): p. 3601-8.
122. Borghol, N., J. Lornage, T. Blachere, A. Sophie Garret, and A. Lefevre, *Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation*. Genomics, 2006. **87**(3): p. 417-26.
123. Khoueiry, R., S. Ibala-Rhomdane, L. Mery, T. Blachere, J.F. Guerin, J. Lornage, and A. Lefevre, *Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes*. J Med Genet, 2008. **45**(9): p. 583-8.
124. Geuns, E., P. Hilven, A. Van Steirteghem, I. Liebaers, and M. De Rycke, *Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes*. J Med Genet, 2007. **44**(2): p. 144-7.
125. Al-Khtib, M., A. Perret, R. Khoueiry, S. Ibala-Romdhane, T. Blachere, C. Greze, J. Lornage, and A. Lefevre, *Vitrification at the germinal vesicle stage does not affect the methylation profile of H19 and KCNQ1OT1 imprinting centers in human oocytes subsequently matured in vitro*. Fertil Steril, 2011. **95**(6): p. 1955-60.
126. El-Maarri, O., K. Buiting, E.G. Peery, P.M. Kroisel, B. Balaban, K. Wagner, B. Urman, J. Heyd, C. Lich, C.I. Brannan, J. Walter, and B. Horsthemke, *Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 341-4.
127. Geuns, E., M. De Rycke, A. Van Steirteghem, and I. Liebaers, *Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(22): p. 2873-9.
128. Zhou, Y., X. Zhang, and A. Klibanski, *MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor*. J Mol Endocrinol, 2012. **48**(3): p. R45-53.
129. Kim, J., W.D. Frey, H. He, H. Kim, M.B. Ekram, A. Bakshi, M. Faisal, B.P. Perera, A. Ye, and R. Teruyama, *Peg3 mutational effects on reproduction and placenta-specific gene families*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83359.
130. Huang, J.M. and J. Kim, *DNA methylation analysis of the mammalian PEG3 imprinted domain*. Gene, 2009. **442**(1-2): p. 18-25.
131. Thiaville, M.M., J.M. Huang, H. Kim, M.B. Ekram, T.Y. Roh, and J. Kim, *DNA-binding motif and target genes of the imprinted transcription factor PEG3*. Gene, 2013. **512**(2): p. 314-20.
132. Jiang, X., Y. Yu, H.W. Yang, N.Y. Agar, L. Frado, and M.D. Johnson, *The imprinted gene PEG3 inhibits Wnt signaling and regulates glioma growth*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8472-80.
133. Li, L., E.B. Keverne, S.A. Aparicio, F. Ishino, S.C. Barton, and M.A. Surani, *Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed Peg3*. Science, 1999. **284**(5412): p. 330-3.
134. Curley, J.P., S. Barton, A. Surani, and E.B. Keverne, *Coadaptation in mother and infant regulated by a paternally expressed imprinted gene*. Proc Biol Sci, 2004. **271**(1545): p. 1303-9.
135. Moore, A.J., *Behavioural genetics: all in the family*. Nature, 2004. **429**(6991): p. 517-8.
136. Chiesa, N., A. De Crescenzo, K. Mishra, L. Perone, M. Carella, O. Palumbo, A. Mussa, A. Sparago, F. Cerrato, S. Russo, E. Lapi, M.V. Cubellis, C. Kanduri, M. Cirillo Silengo, A. Riccio, and G.B. Ferrero, *The KCNQ1OT1 imprinting control region and non-coding RNA: new properties derived from the study of Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome cases*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(1): p. 10-25.

137. Pandey, R.R., T. Mondal, F. Mohammad, S. Enroth, L. Redrup, J. Komorowski, T. Nagano, D. Mancini-Dinardo, and C. Kanduri, *Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation*. Mol Cell, 2008. **32**(2): p. 232-46.
138. Mohammad, F., T. Mondal, and C. Kanduri, *Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs*. Epigenetics, 2009. **4**(5): p. 277-86.
139. Redrup, L., M.R. Branco, E.R. Perdeaux, C. Krueger, A. Lewis, F. Santos, T. Nagano, B.S. Cobb, P. Fraser, and W. Reik, *The long noncoding RNA Kcnq1ot1 organises a lineage-specific nuclear domain for epigenetic gene silencing*. Development, 2009. **136**(4): p. 525-530.
140. Horsthemke, B. and K. Buiting, *Imprinting defects on human chromosome 15*. Cytogenet Genome Res, 2006. **113**(1-4): p. 292-9.
141. Kishore, S. and S. Stamm, *Regulation of alternative splicing by snoRNAs*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 329-34.
142. Saunders, A., F. Faiola, and J. Wang, *Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog*. Stem Cells, 2013. **31**(7): p. 1227-36.
143. Rizzino, A., *Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2009. **1**(2): p. 228-36.
144. Al-Khtib, M., T. Blachere, J.F. Guerin, and A. Lefevre, *Methylation profile of the promoters of Nanog and Oct4 in ICSI human embryos*. Hum Reprod, 2012. **27**(10): p. 2948-54.
145. Nanassy, L. and D.T. Carrell, *Analysis of the methylation pattern of six gene promoters in sperm of men with abnormal protamination*. Asian J Androl, 2011. **13**(2): p. 342-6.
146. Chang, D.F., S.C. Tsai, X.C. Wang, P. Xia, D. Senadheera, and C. Lutzko, *Molecular characterization of the human NANOG protein*. Stem Cells, 2009. **27**(4): p. 812-21.
147. Jerabek, S., F. Merino, H.R. Scholer, and V. Cojocar, *OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(3): p. 138-54.
148. Kang, J., A. Shakya, and D. Tantin, *Stem cells, stress, metabolism and cancer: a drama in two Octs*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(10): p. 491-9.
149. O'Doherty, A.M., C.E. Rutledge, S. Sato, A. Thakur, D.J. Lees-Murdock, K. Hata, and C.P. Walsh, *DNA methylation plays an important role in promoter choice and protein production at the mouse Dnmt3L locus*. Dev Biol, 2011. **356**(2): p. 411-20.
150. Guenatri, M., R. Duffie, J. Iranzo, P. Fauque, and D. Bourc'his, *Plasticity in Dnmt3L-dependent and -independent modes of de novo methylation in the developing mouse embryo*. Development, 2013. **140**(3): p. 562-72.
151. Yokomine, T., K. Hata, M. Tsudzuki, and H. Sasaki, *Evolution of the vertebrate DNMT3 gene family: a possible link between existence of DNMT3L and genomic imprinting*. Cytogenet Genome Res, 2006. **113**(1-4): p. 75-80.
152. Lucifero, D., S. La Salle, D. Bourc'his, J. Martel, T.H. Bestor, and J.M. Trasler, *Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 36.
153. Holz-Schietinger, C. and N.O. Reich, *The inherent processivity of the human de novo methyltransferase 3A (DNMT3A) is enhanced by DNMT3L*. J Biol Chem, 2010. **285**(38): p. 29091-100.
154. Ortega-Hrepich, C., D. Stoop, L. Guzman, L. Van Landuyt, H. Tournaye, J. Smitz, and M. De Vos, *A "freeze-all" embryo strategy after in vitro maturation: a novel approach in women with polycystic ovary syndrome?* Fertil Steril, 2013. **100**(4): p. 1002-7.
155. El Hajj, N., T. Trapphoff, M. Linke, A. May, T. Hansmann, J. Kuhtz, K. Reifenberg, J. Heinzmann, H. Niemann, A. Daser, U. Eichenlaub-Ritter, U. Zechner, and T. Haaf, *Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes*. Epigenetics, 2011. **6**(10): p. 1176-88.
156. Tost, J. and I.G. Gut, *DNA methylation analysis by pyrosequencing*. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2265-75.

157. England, R. and M. Pettersson, *Pyro Q-CpGTM: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing[®]*. *Nature Methods*, 2005. **2**.
158. Bock, C., S. Reither, T. Mikeska, M. Paulsen, J. Walter, and T. Lengauer, *BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(21): p. 4067-8.
159. Rahmann, S., J. Beygo, D. Kanber, M. Martin, B. Horsthemke, and B. Karin, *Amplikyzer: Automated methylation analysis of amplicons from bisulfite flowgram sequencing*. *PeerJ PrePrints*, 2013. **PeerJ PrePrints 1:e122v2**.
160. Gianotten, J., M.P. Lombardi, A.H. Zwinderman, R.J. Lilford, and F. van der Veen, *Idiopathic impaired spermatogenesis: genetic epidemiology is unlikely to provide a short-cut to better understanding*. *Hum Reprod Update*, 2004. **10**(6): p. 533-9.
161. Heyn, H., H.J. Ferreira, L. Bassas, S. Bonache, S. Sayols, J. Sandoval, M. Esteller, and S. Larriba, *Epigenetic disruption of the PIWI pathway in human spermatogenic disorders*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47892.
162. Steptoe, P.C. and R.G. Edwards, *Birth after the reimplantation of a human embryo*. *Lancet*, 1978. **2**(8085): p. 366.
163. Laprise, S.L., *Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies*. *Mol Reprod Dev*, 2009. **76**(11): p. 1006-18.
164. Palermo, G., H. Joris, P. Devroey, and A.C. Van Steirteghem, *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*. *Lancet*, 1992. **340**(8810): p. 17-8.
165. Cha, K.Y., J.J. Koo, J.J. Ko, D.H. Choi, S.Y. Han, and T.K. Yoon, *Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program*. *Fertil Steril*, 1991. **55**(1): p. 109-13.
166. Paoloni-Giacobino, A., *Implications of reproductive technologies for birth and developmental outcomes: imprinting defects and beyond*. *Expert Rev Mol Med*, 2006. **8**(12): p. 1-14.
167. Fauque, P., P. Jouannet, C. Lesaffre, M.A. Ripoche, L. Dandolo, D. Vaiman, and H. Jammes, *Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos*. *BMC Dev Biol*, 2007. **7**: p. 116.
168. Fortier, A.L., F.L. Lopes, N. Darricarrere, J. Martel, and J.M. Trasler, *Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(11): p. 1653-65.
169. Baart, E.B., E. Martini, M.J. Eijkemans, D. Van Opstal, N.G. Beckers, A. Verhoeff, N.S. Macklon, and B.C. Fauser, *Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial*. *Hum Reprod*, 2007. **22**(4): p. 980-8.
170. Steger, K., M.C. Cavalcanti, and H.C. Schuppe, *Prognostic markers for competent human spermatozoa: fertilizing capacity and contribution to the embryo*. *Int J Androl*, 2011. **34**(6 Pt 1): p. 513-27.
171. Montjean, D., S. Belloc, M. Benkhalifa, A. Dalleac, and Y. Menezo, *Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status*. *Hum Reprod*, 2012. **27**(10): p. 2927-32.

5.2 Weitere elektronische Quellen

- Abbildung zur Dichtegradientenaufreinigung von Spermien:
Nidacon, PureSperm® Density Gradient Preparation Protokoll
<http://nidacon.com/products/puresperm-4080/>
- Abbildung zur Konvertierung eines unmethylierten Cytosins:
<http://www.epibeat.com/category/tools-technology/>
- Abbildung zum Bisulfitkonvertierungsprinzips:
<http://www.diagenode.com/en/applications/bisulfite-conversion.php>
- Abbildung zum Prinzip der DBS-Library-Generierung:
Roche 454 Sequencing System Guidelines for Amplicon Experimental Design
http://my454.com/downloads/my454/applications-info/454SequencingSystem_GuidelinesforAmpliconExperimentalDesign_July2011.pdf
- Prinzip der DBS-Libraryaufreinigung mittels AMPure XP Beads:
Beckman Coulter Homepage
<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/nucleic-acid-sample-preparation/agencourt-ampure-xp-pcr-purification/index.htm#2/10//0/25/1/0/asc/2/A63880///0/1//0/>
- Abbildung des emPCR-Prinzips für DBS:
Roche 454 Sequencing Homepage
<http://454.com/products/technology.asp>
- Abbildung zum Sequenzierungsprinzip am GS Junior:
Roche 454 Sequencing Homepage
<http://454.com/products/technology.asp>

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

5mC	Methylcytosin
5mC	Hydroxymethylcytosin
5hmU	5-Hydroxymethyluracil
AID	activation-induced deaminase
AIS	Androgeninsensitivitätssyndrom
AKAP	A-kinase anchoring protein
AR	Androgenrezeptor
ART	Assistierte reproduktive Technologien
AS	Angelman-Syndrom
AUT	Primer A Universal Tag und 454 Titanium für DBS
AZF	azoospermia factor
BB2	Bead Buffer 2
BDD	Bead Deposition Device
Bio	Biotin-Modifikation am Pyrosequenzierprimer
bp	Basenpaare
BRDT	bromodomain containing protein testis-specific
BUT	Primer B Universal Tag und 454 Titanium für DBS
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
CCD	charge-coupled-device
CGI	CpG-Insel
COC	Cumuluszellen-Oocyten-Komplex
COS	controlled ovarian stimulation
CpGs	Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotide
DAZ	deleted in azoospermia
DBS	Deep Bisulfite Sequencing
DMR	differentiell methylierte Region
DNMT	DNA-Methyltransferase
emPCR	Emulsions-PCR
EtBr	Ethidiumbromid

FSH	Follikel stimulierende Hormon
FSHR	FSH-Rezeptor
gDMRs	gametische DMRs
GNRH	gonadotropin-releasing hormone
GTL2	gene trap locus 2
GV	Germinales Vesikel-Stadium
HAT	Histonacetyltransferase
hCG	humanes Choriogonadotropin
HDAC	Histondeacetylase
HMT	Histonmethyltransferase
IAP	intracisternal A particle
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICE	imprint control element
ICR	imprint control region
ICSI	intracytoplasmatische Spermieninjektion
IF	inner forward primer
IG-DMR	intergenische DMR
IMSI	intracytoplasmic morphologically selected sperm injection
IR	inner reverse primer
IUGR	intrauterine growth restriction
IVF	<i>In-vitro</i> -Fertilisation
IVM	<i>In-vitro</i> -Maturation
kb	Kilobasenpaare
LD	Limiting Dilution
LH	Luteinisierendes Hormon
LINEs	long interspersed elements
lncRNA	long non-coding RNA
LNV	large nuclear vesicle
LSH	lymphoid-specific helicase
MI	Meiose-I-Stadium
MII	Meiose-II-Stadium
matUPD14	maternale uniparentale Disomie des Chromosoms 14
Mb	Megabasenpaare

MBP	Methyl-CpG-bindendes Protein
MEG3	maternally expressed gene 3
MIDs	Multiplex Identifiers
miRNA	Mikro-RNA
MSOME	motile sperm organelle morphology examination
MP	Multiplex-PCR
MPC	Magnetic Particle Collector
NGS	Next Generation Sequencing
ncRNA	non-coding RNA
OAT	Oligozoospermie-Asthenozoospermie-Teratozoospermie
ODG	ovarielle Dysgenese
OF	outer forward primer
OHSS	ovarielles Hyperstimulationssyndrom
OR	outer reverse primer
P1 / P2	Protamine 1 und 2
patUPD14	paternale uniparentale Disomie des Chromosoms 14
PBS	phosphate buffered saline
PCOS	Polycystisches Ovarialsyndrom
PCR	polymerase chain reaction
PEG3	paternally expressed gene 3
PGCs	primordial germ cells
PHP-1b	Pseudohypoparathyroidismus 1b
piRNA	Piwi-interacting RNA
PP _i	Pyrophosphat
PRCs	polycomb repressive complexes
PTP	Pico Titer Plate
PWS	Prader-Willi-Syndrom
rcf	relative centrifugal force
RE	retrotransposables Element
rpm	revolutions per minute
SAM	S-Adenosylmethionin
sDMRs	somatische DMRs
snoRNA	small nucleolar RNA

snoRNP	small nucleolar ribonucleoprotein particle
SNRPN	small nucleolar ribonucleoprotein polypeptide N
SOX9	sex-determining region of Y box 9
SRS	Silver-Russel-Syndrom
SRY	sex-determining region of Y
TDG	thymine-DNA-glycosylase
TEs	transposables Element
TET	ten eleven translocation Proteinfamilie
TND	transienter neonataler Diabetes mellitus
TP1 / TP2	Transitionsproteine 1 und 2
TSH	Thyroid stimulierendes Hormon
TSS	Transkriptionsstartstellen
Univ-A	Universal Tag A für DBS-Primer
Univ-B	Universal Tag B für DBS-Primer
UPD	Uniparentale Disomie
UTR	untranslatierte Region
UTTD	Ultra Turrax Tube Drive
WHO	World Health Organization
XCI	X-Chromosom-Inaktivierung
XIST	X inactive-specific transcript

6.2 Maßeinheiten

g	Gramm
mg	Milligramm
ng	Nanogramm
l	Liter
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
M	molare Masse
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
g/mol	Gramm pro Mol
pmol/ μ l	Picomol pro Mikroliter
U	Enzymeinheit
U/ μ l	Enzymeinheit pro Mikroliter
h	Stunde
min	Minute
sec	Sekunde
mm	Millimeter
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung (bei Zentrifugation Angabe Zahl x g)
V	Volt

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Funktionen geprägter Gene.	11
Abbildung 1-2: Unterschiede zwischen maternalen und paternalen gDMRs.	14
Abbildung 1-3: Expressionsregulationsmechanismen geprägter Gene – Insulator- und ncRNA-Modell.	15
Abbildung 1-4: Epigenetische Reprogrammierung.	16
Abbildung 1-5: DNA-Methylierung und Demethylierung.	18
Abbildung 1-6: Epigenetische Modifikationen paternaler DNA während der Spermatogenese.	25
Abbildung 1-7: Epigenetische Reprogrammierung und ART.	35
Abbildung 1-8: Der humane <i>DLK1-MEG3</i> -Locus auf Chromosom 14q32.2.	39
Abbildung 2-1: Dichtegradientenaufreinigung von Spermienproben.	67
Abbildung 2-2: Konvertierung eines unmethylierten Cytosins.	68
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des Bisulfitkonvertierungsprinzips.	69
Abbildung 2-4: Prinzip der Limiting Dilution (LD).	71
Abbildung 2-5: Prinzip der zwei aufeinander aufbauenden PCRs zur Generierung einer DBS-Library.	75
Abbildung 2-6: Prinzip der Libraryaufreinigung mittels Magnetbeads.	78
Abbildung 2-7: Prinzip der Pyrosequenzierung.	82
Abbildung 2-8: DBS-emPCR-Prinzip.	84
Abbildung 2-9: Prinzip der Sequenzierung am GS Junior.	89
Abbildung 3-1: Abnorm methylierte Allele für <i>hGTL2</i> und <i>hPEG3</i> der verschiedenen Spermengruppen.	96
Abbildung 3-2: Identifizierte CpG-Fehler-Allele der verschiedenen Spermengruppen.	97
Abbildung 3-3: Spermien mit mehreren Amplifikaten verschiedener Gene.	98
Abbildung 3-4: Normal methylierte <i>hGTL2</i> -Allele der verschiedenen Spermengruppen.	99
Abbildung 3-5: Normal methylierte <i>hPEG3</i> -Allele der verschiedenen Spermengruppen.	100
Abbildung 3-6: Normal methylierte <i>hLIT1</i> -Allele der verschiedenen Spermengruppen.	101
Abbildung 3-7: Lollipopdiagramme für <i>hDNMT3Lo</i> .	108
Abbildung 3-8: Lollipopdiagramme für <i>hNANOG</i> -Allele.	109
Abbildung 3-9: Lollipopdiagramme für <i>hOCT4</i> .	110
Abbildung 3-10: Lollipopdiagramme für <i>hGTL2</i> .	111
Abbildung 3-11: Lollipopdiagramme für <i>hLIT1</i> .	112
Abbildung 3-12: Lollipopdiagramme für <i>hPEG3</i> .	112
Abbildung 3-13: Lollipopdiagramme für <i>hSNRPN</i> .	113
Abbildung 3-14: <i>hGTL2</i> Boxplot-Darstellung der DBS-Ergebnisse für die verschiedenen Spermengruppen.	137
Abbildung 3-15: <i>hPEG3</i> Boxplot-Darstellung der DBS-Ergebnisse.	138
Abbildung 3-16: <i>hNANOG</i> Boxplot-Darstellung der DBS-Ergebnisse.	139
Abbildung 3-17: <i>hOCT4</i> Boxplot-Darstellung der DBS-Ergebnisse.	140

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Imprinting-Syndrome.	23
Tabelle 1-2: Genetische Ursachen und Umwelteinflüsse, die männliche Infertilität bedingen können.	27
Tabelle 2-1: Verbrauchsmaterialien und Herstellerinformationen.	48
Tabelle 2-2: Verwendete Kits und Herstellerinformationen.	48
Tabelle 2-3: Verwendete Reagenzien und Herstellerinformationen.	49
Tabelle 2-4: Chemikalien und Herstellerinformationen.	49
Tabelle 2-5: Geräte und Herstellerinformationen.	50
Tabelle 2-6: Verwendete Software und Online-Tools.	51
Tabelle 2-7: Limiting Dilution-Untersuchung humaner Oocyten.	54

Tabelle 2-8: Limiting Dilution-Untersuchung humaner Oocyten.	55
Tabelle 2-9: Limiting Dilution-Untersuchung von IMSI-Spermien.	56
Tabelle 2-10: Deep Bisulfite Sequenzierung-Untersuchung von Spermien.....	57
Tabelle 2-11: Deep Bisulfite Sequenzierung-Untersuchung von Spermien.....	58
Tabelle 2-12: WHO-Kriterien (2010) der unteren Referenzgrenzwerte für ein normales Spermogramm.	61
Tabelle 2-13: Spermogrammwerte der verschiedenen mittels DBS untersuchten Spermienproben.	62
Tabelle 2-14: Oocyteninformationen und Patientenzuordnung.....	64
Tabelle 2-15: Bisulfitkonvertierungsprogramm	69
Tabelle 2-16: PCR-Reaktionsansatz für eine Multiplex-PCR zur Untersuchung von Spermien.	72
Tabelle 2-17: PCR-Reaktionsansatz für eine Multiplex-PCR zur Untersuchung von Oocyten.....	73
Tabelle 2-18: PCR-Bedingungen der Multiplex-PCR zur Untersuchung von Spermien.	73
Tabelle 2-19: PCR-Bedingungen der Multiplex-PCR zur Untersuchung von Oocyten.....	73
Tabelle 2-20: PCR-Reaktionsansatz für Nested und Semi-nested PCRs.	74
Tabelle 2-21: Primerkombinationen, Annealingtemperaturen und Zyklenanzahl verschiedener Gene.	74
Tabelle 2-22: PCR-Bedingungen für Nested / Semi-nested PCRs zur Untersuchung von Spermien und Oocyten.	74
Tabelle 2-23: DBS erster PCR-Reaktionsansatz für <i>hPEG3</i> , <i>hOCT4</i> und <i>hNANOG</i>	76
Tabelle 2-24: DBS erster PCR-Reaktionsansatz für <i>hGTL2</i>	76
Tabelle 2-25: DBS erste PCR – genspezifische Annealingtemperaturen und Zyklenanzahl der PCRs.	76
Tabelle 2-26: PCR-Bedingungen der ersten genspezifischen DBS-PCR.	76
Tabelle 2-27: DBS zweiter PCR-Reaktionsansatz.....	77
Tabelle 2-28: PCR-Bedingungen der zweiten DBS-PCR.	77
Tabelle 2-29: Mastermix aus Annealingpuffer und Sequenzierprimer.	83
Tabelle 2-30: Mastermix aus Sepharose und Bindungspuffer zur Templatebindung.	83
Tabelle 2-31: DBS-emPCR Reaktionsansätze für Live Amp Mix A bzw. B.....	84
Tabelle 2-32: DBS-emPCR-Bedingungen.	85
Tabelle 2-33: Pipettierschema für Enzym Pre- und Post-Layer.....	88
Tabelle 3-1: Übersicht Anzahl untersuchter Spermien und Anzahl verwendbarer Spermien für die Auswertung.	94
Tabelle 3-2: Übersicht der Anzahl der je Gen amplifizierten Allele insgesamt und für die verschiedenen Gruppen.	94
Tabelle 3-3: Übersicht der je Spermium amplifizierten Anzahl an Genen.	95
Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Methylierungszustände der untersuchten Allele.....	101
Tabelle 3-5: p-Werte des Vergleichs verschiedener Spermiengruppen hinsichtlich Abnormalität und Häufigkeit von CpG-Fehlern.....	102
Tabelle 3-6: CpG-Fehler-Ratio für die verschiedenen untersuchten Gene im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Spermiengruppen.	102
Tabelle 3-7: Erhöhte CpG-Fehlerrate für <i>hGTL2</i>	103
Tabelle 3-8: Übersicht der untersuchten und von der Analyse ausgeschlossenen humanen Oocyten.	104
Tabelle 3-9: Übersicht der Anzahl pro Oocyte amplifizierter Gene.	105
Tabelle 3-10: Amplifikation geprägter Gene oder nicht geprägter Markergene oder Amplifikation beider Gruppen pro Oocyte.....	105
Tabelle 3-11: Amplifikationseffizienzen der einzelnen untersuchten Gene.	106
Tabelle 3-12: Übersicht abnorm methylierter und normaler Allele im Vergleich IVM gegen <i>in vivo</i> gereifte Oocyten.	107
Tabelle 3-13: Zusammenfassung der Ergebnisse nicht geprägter Gene, geprägter Gene und aller analysierten Gene insgesamt.	114
Tabelle 3-14: Vergleich der IVM und <i>In-vivo</i> -Oocyten hinsichtlich Abnormalität und Häufigkeit von CpG-Fehlern für nicht geprägte Gene, geprägte Gene und alle analysierten Gene insgesamt.	115
Tabelle 3-15: Tabellarische Übersicht der Methylierung nicht geprägter Gene in IVM und <i>In-vivo</i> -Oocyten....	116

Tabelle 3-16: Tabellarische Übersicht der Methylierung geprägter Gene in IVM und <i>In-vivo</i> -Oocyten.	117
Tabelle 3-17: Vergleich IVM und <i>In-vivo</i> -Oocyten für Einzelgene im Hinblick auf Abnormalität und CpG-Fehler.	118
Tabelle 3-18: CpG-Fehler-Raten im Vergleich IVM gegen <i>In-vivo</i> -Oocyten.	119
Tabelle 3-19: Vergleich unreifer und reifer Oocyten hinsichtlich der Häufigkeit abnormer Allele.	121
Tabelle 3-20: Vergleich unreifer und reifer Oocyten hinsichtlich der Häufigkeit von CpG-Fehler-Allelen.	122
Tabelle 3-21: CpG-Fehler-Raten-Vergleich unreifer gegen reife Oocyten.	123
Tabelle 3-22: Verteilung der abnorm methylierten Allele auf die verschiedenen untersuchten Patienten.	124
Tabelle 3-23: Vergleich der verschiedenen untersuchten Gene untereinander hinsichtlich der Häufigkeit von CpG-Fehlern.....	125
Tabelle 3-24: Anzahl analysierbarer Reads der verschiedenen mittels DBS untersuchten Gene.	127
Tabelle 3-25: Übersicht der je Probe erhaltenen Reads.	127
Tabelle 3-26: Ergebnisse des Triplett-Tests.	128
Tabelle 3-27: Anteil normal und abnorm methylierter Reads aller Proben der verschiedenen untersuchten Spermiengruppen.....	130
Tabelle 3-28: Methylierungsmittelwerte in Prozent aller einzelnen analysierten Proben.	130
Tabelle 3-29: Unterschiede in den Häufigkeiten normaler, abnormer und intermediärer Methylierung der untersuchten Allele zwischen den verschiedenen Genen.....	131
Tabelle 3-30: Vergleich der einzelnen Gene hinsichtlich ihrer Prozentanteile normal, intermediär und abnorm methylierter Allele.....	132
Tabelle 3-31: Übersicht für <i>hGTL2</i> : Prozentanteile normal methylierter, intermediärer und abnorm methylierter Allele.....	133
Tabelle 3-32: Übersicht für <i>hPEG3</i> : Prozentanteile normal methylierter, intermediärer und abnorm methylierter Allele.....	134
Tabelle 3-33: Übersicht für <i>hNANOG</i> : Prozentanteile normal methylierter, intermediärer und abnorm methylierter Allele.....	135
Tabelle 3-34: Übersicht für <i>hOCT4</i> : Prozentanteile normal methylierter, intermediärer und abnorm methylierter Allele.....	136
Tabelle 3-35: Proben mit erhöhtem Anteil abnormer Allele in mindestens einem Gen.	141
Tabelle 3-36: Anzahl der Proben mit mehr als 1% abnorm methylierten Allelen bzw. ohne abnorme Allele je Spermiengruppe.....	142
Tabelle 3-37: Statistische Auswertung der DBS-Ergebnisse.....	143

7 Curriculum vitae

Name: Juliane Kuhtz
 Geburtsdatum und Geburtsort: 09.01.1983 in Magdeburg, Deutschland
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

1989 – 1993 Grundschole „Am Fliederhof“ in Magdeburg
 1993 – 1995 Realschole „Werner Lamberz“ in Magdeburg
 1995 – 1996 Gymnasium „Carl Leberecht Immermann“ in Magdeburg
 1996 – 2002 Gymnasium „Albert Einstein“ in Magdeburg
 Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife; Abitur mit Abschlussnote 2,1

Studium und Promotion

10/2002 – 12/2008 Biologie-Studium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
 12/2007 Diplomprüfungen: Neurobiologie (Hauptfach), Zell- und Entwicklungsbiologie (Nebenfach), Humangenetik (Nebenfach)
 02/2008 – 12/2008 Diplomarbeit, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Brand, Zell- und Entwicklungsbiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Thema: „Struktur-Funktionsanalyse der Popeye-Domäne des Popdc1-Proteins der Maus: „site-directed“ Mutagenese, cAMP-Bindung und phänotypische Charakterisierung“
 Abschluss: Diplom-Biologin Univ., Endnote Diplom: „sehr gut“ (1,5)
 04/2009 – 09/2010 Doktorarbeit, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Brand, Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Oktober 2009: Wechsel der Arbeitsgruppe an das Heart Science Centre Harefield / Imperial College London, United Kingdom; Thema: „Genetic and biochemical analysis of the structure-function relationship of the Popdc family“; kein akademischer Grad erworben
 09/2010 Abbruch des Promotionsvorhabens in der Arbeitsgruppe Brand und Rückkehr nach Würzburg / Deutschland
 10/2010 – 12/2014 Promotion in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Haaf, Institut für Humangenetik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Thema: „Epi-mutationen humaner Keimzellen und Infertilität“
 Bis 31.03.2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik der Julius-Maximilians Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Würzburg, Januar 2015

Juliane Kuhtz

8 Publikationen und Kongressbeiträge

8.1 Publikationen

Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice.

Froese A., Breher S.S., Waldeyer C., Schindler R.F., Nikolaev V.O., Rinné S., Wichmeyer E., Schlueter J., Becher J., Simrick S., Vauti F., **Kuhtz J.**, Meister P., Kreissl S., Torlopp A., Liebig S.K., Laakmann S., Müller T.D., Neumann J., Stieber J., Ludwig A., Maier S.K., Decher N., Arnold H.H., Kirchhof P., Fabritz L., Brand T.

J Clin Invest. 2012 Mar 1; 122(3):1119-30. doi: 10.1172/JCI59410. Epub 2012 Feb 22.

Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes.

El Hajj N., Trapphoff T., Linke M., May A., Hansmann T., **Kuhtz J.**, Reifenberg K., Heinzmann J., Niemann H., Daser A., Eichenlaub-Ritter U., Zechner U, Haaf T.

Epigenetics 2011 Oct 1; 6(10):1176-88. doi: 10.4161/epi.6.10.17202. Epub 2011 Oct 1.

Broad DNA methylation changes of spermatogenesis, inflammation and immune response-related genes in a subgroup of sperm samples for assisted reproduction.

Schütte B., El Hajj N., **Kuhtz J.**, Nanda I., Gromoll J., Hahn T., Dittrich M., Schorsch M., Müller T., Haaf T.

Andrology 2013 Nov; 1(6):822-9. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00122.x. Epub 2013 Aug 28.

Human *in vitro* oocyte maturation is not associated with increased imprinting error rates at LIT1, SNRPN, PEG3 and GTL2.

Kuhtz J., Romero S., De Vos M., Smitz J., Haaf T. and Anckaert E.

Hum Reprod. 2014 Sep; 29(9):1995-2005. doi: 10.1093/humrep/deu155. Epub 2014 Jun 24.

Epigenetic heterogeneity of developmentally important genes in human sperm: implications for assisted reproduction outcome

Kuhtz J., Schneider E., El Hajj N., Zimmermann L., Fust O., Linek B., Seufert R., Hahn T., Schorsch M. and Haaf T.

Epigenetics, accepted 06.11.2014

Limiting dilution bisulfite pyrosequencing: a method for methylation analysis of individual DNA molecules in a single or a few Cells

El Hajj N., **Kuhtz J.** and Haaf T. (2014; in press)

Buchserie "Methods in Molecular Biology", Titel des Buches: "Pyrosequencing Methods and Protocols", Editors: Ulrich Lehmann (PhD) and Jörg Tost (PhD), Springer-Verlag

8.2 Kongressbeiträge

DNA Methylation analysis in human IVM oocytes

(eigene Präsentation der selbst erzielten aktuellen Forschungsergebnisse)

Germ Cell Potential Meeting 02.-03.11.2012 Münster; Workshop of the DFG Research Unit 'Germ Cell Potential' FOR 1041; Project 11: *In-vitro* maturation (IVM) – clinical follow up of pregnancies achieved by *in-vitro* maturation and consecutive IVF and analysis of IVM oocytes in the human and a mouse model

Epimutation analysis of individual human IVM oocytes

(eigene Präsentation der selbst erzielten aktuellen Forschungsergebnisse)

Germ Cell Potential Meeting 04.-05.12.2013 Münster; Workshop of the DFG Research Unit 'Germ Cell Potential' FOR 1041; Project 11: *In-vitro* maturation (IVM) – clinical follow up of pregnancies achieved by *in-vitro* maturation and consecutive IVF and analysis of IVM oocytes in the human and a mouse model

Methylation analysis of three imprinted genes in ICSI versus IMSI sperms by limiting dilution bisulfite pyrosequencing

(Poster P11.033)

Kuhtz J, Hansmann T, El Hajj N, Schneider E, Linek B, Hahn T, Schorsch M, and Haaf T.

ESHG – European Society of Human Genetics, Kongress 23.-26.06.2012 Nürnberg, Deutschland

DNA methylation analysis of *in vitro* matured human oocytes retrieved from small antral follicles

(Poster P-Prenat-251)

Kuhtz J, Anckaert E, Romero S, De Vos M, Smitz J, and Haaf T.

GfH – Gesellschaft für Humangenetik, Kongress 19.-21.03.2014, Essen, Deutschland

DNA methylation analysis of *in vitro* matured human oocytes retrieved from small antral follicles

(Vortrag von Herrn Prof. Haaf; O-173)

Haaf T, **Kuhtz J**, Romero S, De Vos M, Smitz J, and Anckaert E.

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology, Kongress 29.06.-02.07.2012, München, Deutschland