

**Der Einfluss von ausgewählten Chromatin-
Remodeling-Faktoren und Histonmodifikationen
auf die männliche Fertilität**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**VORGELEGT VON STEILMANN, CORNELIA
AUS LÜDENSCHIED**

Gießen 2010

Aus dem Institut für Urologie, Kinderurologie und Andrologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen,
geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Weidner

1. Gutachter und Betreuer : Prof. Dr. Klaus Steger

2. Gutachter : Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Tag der Disputation: 29.06.2010

Meiner Familie und Marco

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Originalarbeiten

Steilmann C., Cavalcanti M. C. O., Bartkuhn M., Pons-Kühnemann J., Schuppe H.-C., Weidner W., Steger K., Paradowska A. The interaction of modified histones with the bromodomain testis-specific (BRDT) gene and its mRNA level in sperm of fertile donors and subfertile men. *Reproduction* (im Druck)

Steilmann C., Paradowska A., Bartkuhn M., Schuppe H.-C., Bergmann M., Kliesch S., Weidner W., Steger K. Expression of H3K9ac in male germ cells and its distribution pattern in the genome of human sperm. *Reprod Biomed Online* (zur Veröffentlichung eingereicht)

Poster und Abstracts

15. European Testis Workshop with NAFA annual meeting, Naantali, Finnland, 2.-6. Mai 2008, Poster: The interaction of BRDT gene with acetylated lysine 9 at histone 3 in spermatozoa of fertile men. Steilmann C., Schumacher S., Steger K., Weidner W., Paradowska A.

20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Halle, 11.-13. September 2008, Poster und Abstract (*Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*): Die Acetylierung von Lysin 9 in Histon 3 (H3K9ac) in männlichen Keimzellen und ihre Funktion für die Genexpression in der normalen Spermatogenese beim Menschen. Steilmann C., Paradowska A., Weidner W., Bergmann M., Steger K.

60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Stuttgart, 24.-27. September 2008, Poster: Das BRDT Gen interagiert mit spezifisch acetylierten Histonen in Spermatozoen von fertilen Männern. Steilmann C., Schumacher S., Steger K., Weidner W., Paradowska A.

1. GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 30. September -1. Oktober 2008, Poster: Acetylation of H3K9ac in male germ cells and its function for expression of genes in normal human spermatogenesis. Steilmann C., Paradowska A., Weidner W., Bergmann M., Steger K.

5. European Congress of Andrology, Rome, Italy, 26.-28. November 2008, Poster und Abstract (International Journal of Andrology): The BRDT gene interacts with specific modified histones in spermatozoa of fertile and infertile men. Steilmann C., Schumacher S., Steger K., Weidner W., Paradowska A.

5. European Congress of Andrology, Rome, Italy, 26.-28. November 2008, Poster und Abstract (International Journal of Andrology): Acetylation of H3K9ac in male germ cells and its function for expression of genes in normal human spermatogenesis. Steilmann C., Paradowska A., Weidner W., Bergmann M., Steger K.

9. International Congress of Andrology, Barcelona, Spain, 07.-10. März 2009, Poster: The BRDT gene interacts with modified histones in spermatozoa of fertile and infertile men. Steilmann C., Schumacher S., Steger K., Weidner W., Paradowska A.

9. International Congress of Andrology, Barcelona, Spain, 07.-10. März 2009, Poster: Expression of H3K9ac in male germ cells and its binding pattern to genes involved in normal human spermatogenesis. Steilmann C., Paradowska A., Bergmann M., Weidner W., Steger K.

1. International Workshop Molecular Andrology, Gießen, 8.-10. Mai 2009, Poster: Expression of H3K9ac in male germ cells and its binding pattern to genes involved in normal human spermatogenesis. Steilmann C., Paradowska A., Bergmann M., Weidner W., Steger K.

Vorträge

20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Halle, 11.-13. September 2008: Die Interaktion des BRDT Gens mit modifizierten Histonen von fertilen Männern. Steilmann C. (als Gastsprecher)

2. GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 30. September -1. Oktober 2008, Vortrag und Abstract: Acetylation of H3K9ac in male germ cells and its function for expression of genes in normal human spermatogenesis. Steilmann C., Paradowska A., Weidner W., Bergmann M., Steger K.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	13
1. Einleitung und Ziele	14
2. Literaturübersicht	16
2.1 Morphologie des Hodens und Ablauf der Spermatogenese beim Menschen (<i>Homo sapiens</i>)	16
2.1.1 Bau des Hodens	16
2.1.2 Das Keimepithel	16
2.1.3 Ablauf der Spermatogenese	18
2.1.4 Die Stadien der Spermatogenese	20
2.1.5 Dauer der Spermatogenese	22
2.1.6 Störungen der Spermatogenese	23
2.1.7 Hormonelle Regulation der Spermatogenese	23
2.2 Ejakulat	24
2.2.1 Zelluläre Bestandteile des Ejakulats	24
2.2.1.1 Spermatozoen	24
2.2.1.2 Weitere Zellen	26
2.2.2 Seminalplasma	27
2.3 Chromatinkondensation und Histon-Protamin-Austausch während der Spermatogenese	28
2.3.1 Histone	28
2.3.2 Transitionsproteine und Protamine	29
2.4 Genetische Kontrollmechanismen während der Spermatogenese	31
2.4.1 Transkription	31
2.4.2 Translation	32
2.4.3 Mögliche Funktionen von Spermientranskripten	32
2.5 Epigenetische Kontrollmechanismen während der Spermatogenese	33
2.5.1 DNA-Methylierung	33
2.5.2 Histonmodifikationen	34

2.5.3 Mögliche Funktionen von Kernhistonen	36
2.6 Der epigenetische Chromatin-Remodeling-Faktor BRDT	37
3. Material	39
3.1 Geräte	39
3.2 Chemikalien	40
3.3 Lösungen, Puffer, Medien	41
3.4 Molekularbiologische Reagenzien und fertige Reagenzienansätze (Kits)	43
3.5 Antikörper	44
3.6 Primer	45
3.7 Sequenzierungen	50
3.8 Behandlungsmaterial	50
3.8.1 Ejakulat von fertilen Spendern	50
3.8.2 Ejakulat von infertilen Patienten	51
3.8.3 Humane Hodenbiopsien	54
3.8.4 Referenzmaterial	55
3.9 Verbrauchsmaterialien	56
3.10 Andere Materialien	57
3.11 Computerprogramme und Internetseiten	57
4. Methoden	58
4.1 Das Spermogramm	58
4.2 Anilinblau-Test (Status der Chromatinkondensation)	63
4.3 Spermienwaschung	63
4.3.1 Swim-up	64
4.4 Immunhistochemie	64
4.4.1 Immunhistochemie an Ejakulat	65
4.4.1.1 Vorbehandlung der Spermien	65
4.4.1.2 Immunhistochemische Reaktion	65
4.4.2 Immunhistochemie an Hodenbiopsien	66
4.4.2.1 Fixierung in Bouin	66
4.4.2.2 Dehydrierung und Einbettung in Paraffin	66

4.4.2.3 Herstellung von Schnitten	66
4.4.2.4 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung	67
4.4.2.5 Immunhistochemische Reaktion	67
4.5 Bestimmung von Protein-/ Nukleinsäurekonzentrationen	68
4.5.1 Photometrische Protein-Messung mittels BCA	69
4.5.2 Photometrische Protein-Messung nach Bradford	69
4.6 Messung von Nukleinsäuren am NanoDrop-Gerät	70
4.7 Histon-Extraktion für Western Blot	70
4.8 Western Blot	71
4.8.1 Gel-Elektrophorese	72
4.8.2 Transfer und Coomassie-Färbung	72
4.8.3 Nachweisreaktion	73
4.9 Chromatin-Immunpräzipitation	74
4.9.1 ChIP mit Ejakulat	75
4.9.2 ChIP mit HeLa-Zellen	78
4.9.3 ChIP mit Prostata-Gewebe	78
4.10 DNA-Aufreinigung	78
4.10.1 Der QiaQuick-Aufreinigungs-kit	79
4.10.2 Der Illustra GFX PCR, DNA- und Gelbanden-Aufreinigungs-kit	79
4.10.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	80
4.10.3.2 Ethanolfällung von DNA	80
4.11 Polymerase-Ketten-Reaktion	80
4.11.1 Primer-Generierung	81
4.11.2 Semiquantitative PCR	81
4.11.3 Real time PCR für ChIP	82
4.11.4 Statistische Analyse von real time PCR	83
4.12 Agarose-Gel-Elektrophorese	83
4.13 WGA und Reamplifizierung von DNA	84
4.14 DNA-Microarrays	85
4.14.1 Die ENCODE-Regionen	86
4.14.2 Das ENCODE-Array	87
4.15 RNA-Analysen	91
4.15.1 Isolierung aus Ejakulat und Hoden	91
4.15.2 Isolierung aus Blut	92

5.3.1.2 Die Anreicherung von modifizierten Histonen am <i>BRDT</i> -Gen ist in Spermien-Chromatin von infertilen Männern tendenziell reduziert	111
5.3.2 Die mRNA-Expression des <i>BRDT</i> -Gens in Spermien	113
5.3.2.1 Die aus humanen Spermien isolierte mRNA war von guter Qualität und frei von Kontaminationen	113
5.3.2.2 <i>ACTB</i> und <i>GAPDH</i> waren die besten Referenzgene in RT-PCR-Experimenten in Spermien	114
5.3.2.3 BRDT-mRNA ist in Spermien von fertilen und infertilen Männern exprimiert	115
5.3.2.3.1 Die BRDT-mRNA-Expression weicht in fertilen Männern signifikant von der Normalverteilung ab	116
5.3.2.3.2 Es besteht ein signifikanter Unterschied in der BRDT-mRNA-Expression zwischen fertilen und infertilen Männern	116
6. Diskussion	118
6.1 Eine gestörte Chromatinkondensation konnte häufiger bei infertilen als bei fertilen Männern nachgewiesen werden	118
6.2 Potentielle Funktionen von H3K9ac in Spermien von fertilen und infertilen Männern	119
6.2.1 Der H3K9ac-Antikörper ist spezifisch	119
6.2.2 Die H3K9ac-Protein-Expression zeigt keinen Unterschied zwischen der Spermatogenese und Spermien von fertilen und infertilen Männern	119
6.2.3 H3K9ac ist mit unterschiedlichen Genregionen in Spermien von fertilen und infertilen Männern assoziiert	121
6.2.4 Die mit H3K9ac assoziierten Gene haben zum Teil Funktionen in der Embryonalentwicklung	124
6.3 Der Zusammenhang von H3K9ac und dem BRDT-Protein	126
6.4 Hypothesen zur BRDT-Expression in Spermien von fertilen und infertilen Männern	127

6.4.1 Die Reduzierung der epigenetischen Markierungen am <i>BRDT</i> - Gen in infertilen Männern führt zu veränderter Expression	127
6.4.2 Die BRDT-mRNA-Expression unterscheidet sich zwischen fertilen und infertilen Männern	130
6.5 Schlussfolgerungen	131
7.1 Zusammenfassung	132
7.2 Summary	134
8. Literaturverzeichnis	136
Erklärung	156
Danksagung	157

Abkürzungen

Abb.	Abbildung	PCR	Polymerase Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> , destilliertes Wasser		
bp	Basenpaare	pH	<i>pondus hydrogenii</i> [-log ₁₀ c(H ₃ O ⁺)]
kb	Kilobasenpaare (10 ³ bp)		
ca.	circa	RT	Raumtemperatur
DNA	Deoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>	RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxyribonucleosid- triphosphat	mRNA	Boten-RNA, engl. <i>messenger-RNA</i>
engl.	englisch	s.	siehe
et al.	<i>et alii</i> , und andere	sek.	Sekunde
°C	Grad Celsius	s. o.	siehe oben
g	Gramm	Tab.	Tabelle
kg	Kilogramm (10 ³ g)	TSS	Transkriptionsstart, engl. <i>transcription start site</i>
mg	Milligramm (10 ⁻³ g)		
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)	U	Unit
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹ g)	UV	Ultraviolett
h	Stunde, engl. <i>hour</i>	rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rounds per minute</i>
l	Liter		
ml	Milliliter (10 ⁻³ l)	UTR	untranslatierte Region
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)	vgl.	vergleiche
m	Meter	V	Volt
cm	Zentimeter (10 ⁻² m)	Vol	Volumen
mm	Millimeter (10 ⁻³ m)	(v/v)	<i>volume per volume</i>
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)	(w/v)	<i>weight per volume</i>
min	Minute	z. B.	zum Beispiel
M	Molar (mol/l)		
mM	Millimolar (mmol/l)		

1. Einleitung und Ziele

Die Spermatogenese ist ein Prozess, bei dem aus diploiden Stammzellen haploide Spermien entstehen. Dabei werden DNA bindende Histone gegen Protamine ausgetauscht (Tanphaichitr et al., 1978), was eine starke Kondensation des Chromatins und einen Stopp der Transkription bewirkt (Steger, 1999). Die Reorganisation des Chromatins erfolgt mit Hilfe von Chromatin-Remodeling-Faktoren, die unter anderem modifizierte Histone binden können (Pivot-Pajot et al., 2003; Morinière et al., 2009). Welche Chromatin-Remodeling-Faktoren in männlichen Keimzellen aktiv sind, ist erst teilweise geklärt.

Beim Menschen erfolgt der Austausch der Histone durch Protamine nur zu 85% (Tanphaichitr et al., 1978), was auf eine mögliche Funktion der Rest-Histone schließen lässt. Der Austausch der Histone erfolgt nicht zufällig, sondern an speziellen Genomregionen (Gatewood et al., 1987; Gardiner-Garden et al., 1998). Daher wird vermutet, dass die verbleibenden Histone von Spermatozoen essentielle Markierungen tragen, die als epigenetische Informationen für den Nachwuchs dienen (Ostermeier et al., 2004; Rousseaux et al., 2008). Epigenetische Abnormalitäten im männlichen Genom können Fehler bei der Befruchtung verursachen (Reik und Walter, 2001; Cox et al., 2002; De Rycke et al., 2002; DeBaun et al., 2003; Rousseaux et al., 2004; Marques et al., 2004; Allegrucci et al., 2005).

Viele Histon-Modifikationen finden an Histon 3 an Lysin 9 (H3K9) statt und werden in die Eizelle übertragen (Santos et al., 2005). Ein Beispiel ist acetyliertes Histon 3 an Lysin 9 (H3K9ac), welches in der Spermatogenese der Maus in Spermatozyten bis elongierten Spermatischen exprimiert ist (Delaval et al., 2007). Darum stellen H3K9-Modifikationen geeignete Kandidaten für die Analyse von epigenetischen Markierungen dar.

Ergebnisse dieser Arbeit sollen epigenetische Fehler aufdecken, die zu einer mangelnden Entwicklung von Embryonen führen, die aus unvollständig ausgereiften Spermien entstanden sind.

1. Ein Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsmuster von H3K9ac in Hodenbiopsien mit normaler und fehlerhafter Spermatogenese und im Ejakulat von fertilen und infertilen Männern zu analysieren. Es sollte gezeigt werden, inwieweit diese Modifikation in der Spermatogenese vorhanden ist und somit als potentielle Information für die Übertragung in den Embryo in Frage kommt und ob es Unterschiede in der Expression zwischen fertilen und infertilen Männern gibt.

2. Des Weiteren sollten mittels Chromatin-Immunpräzipitation und Microarray-Analysen Gen-Bindungsstellen identifiziert werden, die mit H3K9ac assoziiert sind. Zusätzlich sollten die Unterschiede der Bindungsfähigkeit von H3K9ac an diese Gene bei fertilen und infertilen Männern analysiert werden.

3. Außerdem sollten Histonmodifikationen identifiziert werden, die mit dem Chromatin-Remodeling-Faktor *BRDT* (*bromodomain testis-specific*)-Gen assoziiert sind. Zusätzlich sollte das mRNA-Expressionsmuster von BRDT im Ejakulat von fertilen und infertilen Männern analysiert werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Morphologie des Hodens und Ablauf der Spermatogenese beim Menschen (*Homo sapiens*)

2.1.1 Bau des Hodens

Die Spermatogenese des Menschen läuft in den beiden Hoden ab, die im Hodensack (*Skrotum*) liegen und von einer Bindegewebskapsel, der *Tunica albuginea*, und einem Mesothel (*Epididymium*) umschlossen sind. Radiär verlaufende Septen (*Septula testis*) unterteilen den Hoden in ca. 250-350 Hodenläppchen (*Lobuli testis*). In den Hodenläppchen befinden sich 500-800 Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi contorti*), in denen die Spermatogenese stattfindet. Sie bestehen aus einer sie umschließenden Wand (*Lamina propria*) und dem Keimepithel. Die Samenkanälchen münden in das *Rete testis*, welches über die *Ductuli efferentes* zum Nebenhodenkopf (*Caput epididymis*) führt (Hees und Sinowatz, 2000; Bergmann, 1998).

Zwischen den Samenkanälchen befinden sich Leydig Zellen, kollagenes Bindegewebe, Nervenbahnen, sowie Blut- und Lymphgefäße. Die Leydig Zellen sind steroidogene Zwischenzellen und sondern das männliche Sexualhormon Testosteron ab, das gebunden an ABP (*Androgen Binding Protein*) in Sertoli Zellen gelangt. Dort sorgt es für die Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese (Bergmann, 1998; Nieschlag und Behre, 2000).

2.1.2 Das Keimepithel

Das Keimepithel ist von der *Lamina propria* umgeben, die aus vier bis fünf Lagen kontraktiler Zellen (Myofibroblasten), Fibroblasten und kollagenen Zellen besteht. Die Myofibroblasten kontrahieren periodisch, was wahrscheinlich durch Oxytoxin ausgelöst wird und sorgen somit für peristaltische Bewegungen der *Tubuli seminiferi*. Dabei werden die Spermatozoen zum *Rete testis* und in den Nebenhoden transportiert (Bergmann, 1998). Des Weiteren besteht das Keimepithel aus verschiedenen Generationen von Keimzellen und aus Sertoli Zellen (**Abb. 1**).

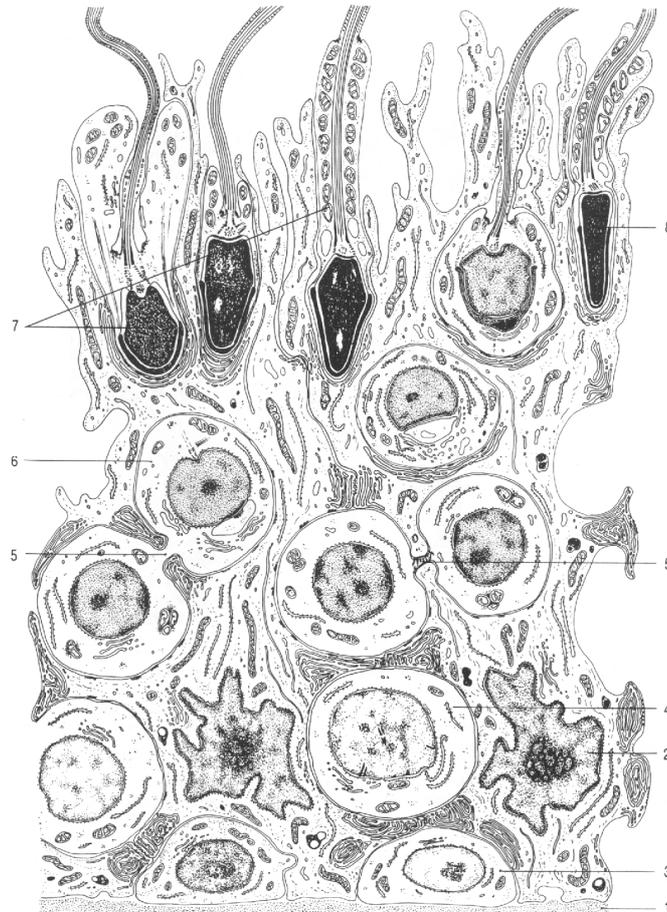


Abb. 1: Schematische Darstellung des menschlichen Keimepithels: 1 = Basalmembran, 2 = Zellkern einer Sertoli Zelle, 3 = Spermatogonie, 4 = Spermatozyte, 5 = Interzellularbrücke, 6 = runde Spermatide, 7-8 = verschiedene Differenzierungsstufen auf dem Weg von der elongierten Spermatide zum Spermatozoon (Hees und Sinowatz, 2000).

Die Sertoli Zellen grenzen an die Basalmembran der *Lamina propria* und führen bis ins Lumen. Sie sind an ihrem großen ellipsoiden Zellkern erkennbar. Sertoli Zellen haben mehrere wichtige Funktionen:

Unter anderem phagozytieren sie abgestorbene Zellen und die Residualkörper der reifen Spermatozoen, die diese Zytoplasmareste bei der Reifung abstreifen. Des Weiteren sind benachbarte Sertoli Zellen in ihrem basalen Drittel über *tight junctions* (*Zonulae occludentes*) verbunden und bilden die Blut-Hoden-Schranke. Diese Barriere sorgt dafür, dass der Stofftransport im interzellulären Raum eingeschränkt ist, genauer gesagt, zwischen dem basalen (Spermatogonien und präleptotäne Spermatozyten I) und dem adluminalen Kompartiment (alle weiteren Keimzellstadien).

Diese immunologische Grenze verhindert eine Autoimmunreaktion, die durch die Oberflächenantigene der Keimzellen ab dem Stadium der zygotänen/pachytänen Spermatozyten ausgelöst werden kann. So werden alle adluminalen Keimzellstadien von Sertoli Zellen und nicht direkt aus der Blutbahn mit Nährstoffen versorgt. Dabei spielen Eigensynthese, selektiver Transport und vektorielle Sekretion eine wichtige Rolle. (Griswold, 1998).

Des Weiteren verfügen Sertoli Zellen über endokrine Funktionen. Sie besitzen hierzu Rezeptoren für Testosteron und FSH (Follikel stimulierendes Hormon) und synthetisieren verschiedene Proteine wie das Inhibin, welches die Freisetzung von FSH aus dem Hypophysenvorderlappen reguliert (Bergmann, 1998; Hees und Sinowatz, 2000).

2.1.3 Ablauf der Spermatogenese

Die Spermatogenese beginnt mit Stammzellen (= **Spermatogonien**; $46xy$, $2n$, $2c$ DNA) (**Abb. 2**), die an die Basalmembran der *Tubuli seminiferi* grenzen. Man unterscheidet zwei Typen von Spermatogonien, A und B. Spermatogonien des Typs A gliedern sich weiter in Typ Ad ($d = \text{dark} = \text{dunkel}$) mit einem ovalen dunklen Kern und Ap ($p = \text{pale} = \text{hell}$) mit einem runden heterochromatischen Kern. Ad-Spermatogonien differenzieren sich durch mitotische Teilungen zu Ap-Spermatogonien, dann zu intermediären Spermatogonien und schließlich zu Spermatogonien des Typs B. Spermatogonien des Typs B sind ebenfalls mitotisch aktiv, aber lösen sich anschließend von der Basalmembran ab und treten in die Meiose ein. In der Prophase der Meiose wird die DNA dupliziert. Man bezeichnet dieses Stadium als **Präleptotän**. Präleptotäne Zellen werden als **Spermatozyten erster Ordnung** bezeichnet und sind tetraploid ($46xy$, $2n$, $4c$ DNA). Histologisch kann man sie nur schwer von Spermatogonien Typ B unterscheiden, jedoch haben sie keine Verbindung zur Basalmembran. Es folgen anschließend verschiedene Phasen der Meiose, die sich an Hand des Chromatins unterscheiden lassen:

Im **Leptotän** kondensiert das Chromatin und wird sichtbar. Im **Zygotän** paaren sich die homologen Chromosomen durch Ausbildung des synaptonemalen Komplexes. Zur Chiasmabildung mit *Crossing over* kommt es dann im **Pachytän**. Zusätzlich kondensiert das Chromatin weiter und der Zellkern vergrößert sich. Im **Diploptän** trennen sich die Chromosomen voneinander.

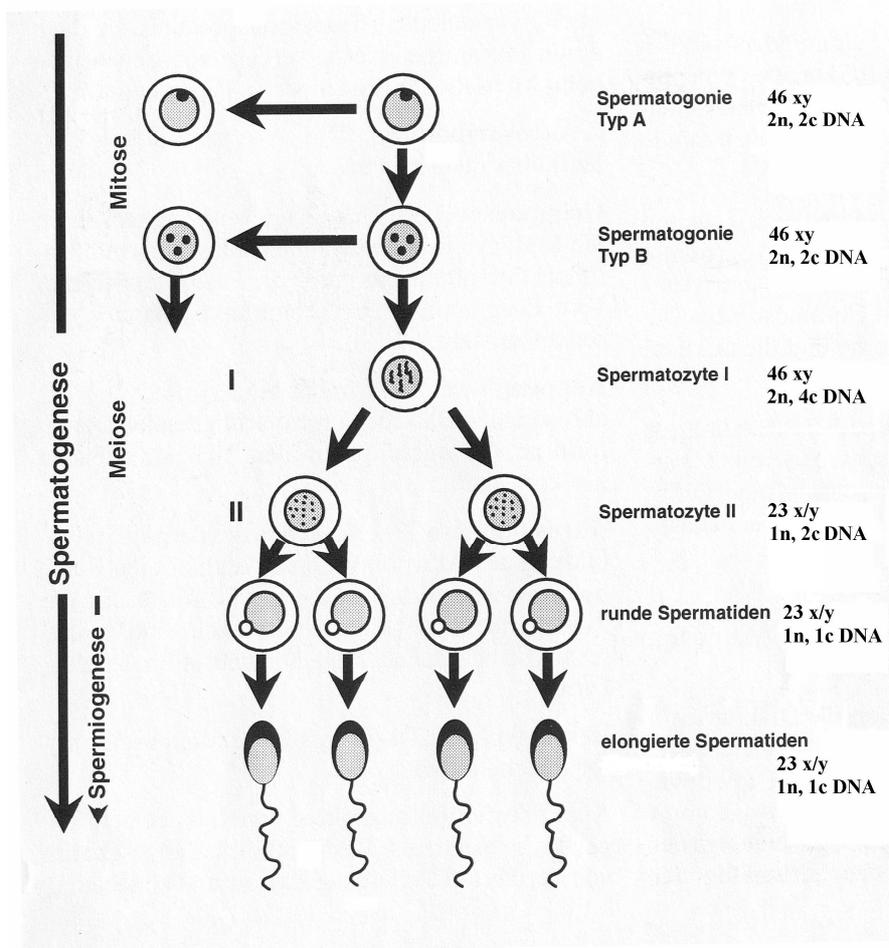


Abb. 2: Schematische Darstellung der Spermatogenese. Eine Stammzelle teilt sich in eine Tochterzelle und eine Spermatogonie Typ A. Diese teilt sich mehrfach mitotisch und wird zur Spermatogonie Typ B. Am Ende ihrer Differenzierungsphase wird sie zur diploiden primären Spermatozyte und tritt in die Meiose I ein. Nach der ersten Reifeteilung wird die primäre Spermatozyte zur sekundären Spermatozyte und durchläuft die II. meiotische Teilung. Am Ende der Meiose liegen haploide runde Spermatiden vor, die über Zyttoplasmabrücken miteinander verbunden sind. Die Spermatiden durchlaufen einen morphologischen Umwandlungsprozess (Spermiogenese), wobei am Ende reife Spermatozoen in das Tubuluslumen entlassen werden (Spermiation) (Bergmann, 1998).

Am Ende der ersten Reifeteilung ist der Chromosomensatz halbiert, der DNA-Gehalt jedoch diploid. Es entstehen zwei Tochterzellen, die **Spermatozyten zweiter Ordnung** (23x oder y, 1n, 2c DNA). Sekundäre Spermatozyten treten in die zweite Reifeteilung ein. Der DNA-Gehalt wird dabei auf 1n halbiert und es entstehen wiederum zwei Tochterzellen, die **Spermatiden** (23x, 1n, 1c DNA oder 23y, 1n, 1c DNA). Nun folgt die **Spermiogenese**, in der sich die Spermatiden zu reifen **Spermatozoen** differenzieren. Drei Prozesse sind dabei von Bedeutung: die Kondensation des Zellkerns, die Akrosombildung und die Bildung des Flagellums.

Dabei reduziert der Zellkern sein Volumen auf ein Zehntel durch Ersetzen der Histone zunächst durch Transitionsproteine und anschließend durch Protamine.

Das **Akrosom** wird in mehreren Phasen ausgebildet: Zuerst findet die **Golgi**phase statt, bei der ein akrosomales Bläschen aus fusionierten Lysosomen entsteht. Dann folgt die **Kappenphase**, wobei sich das Bläschen abflacht und sich auf den Zellkern auflagert. In der **Akrosomphase** wird das Akrosom ausgebildet. Es enthält hydrolytische Enzyme, die das Eindringen in die *Zona pellucida* der Eizelle ermöglichen. Abschließend erfolgt die **Reifungsphase**, in der das Akrosom seine artspezifische Form erhält und der Residualkörper abgeschnürt wird.

Die Keimzellen bleiben während des Differenzierungsprozesses von der Spermatogonie zur Spermatide miteinander verbunden und bilden Klone.

Am Ende des Differenzierungsprozesses entstehen elongierte Spermatiden, die in das Lumen des Keimtubulus abgegeben werden (**Spermiation**) und dann als Spermatozoen oder Spermien bezeichnet werden.

Die Effektivität der menschlichen Spermatogenese liegt bei 6×10^6 Spermatozoen pro Gramm Hodengewicht pro Tag (Bergmann, 1998).

2.1.4 Die Stadien der Spermatogenese

Die menschliche Spermatogenese ist ein kontinuierlicher Prozess. Im Querschnitt der Keimtubuli lassen sich bei normaler Spermatogenese beim Menschen sechs verschiedene Assoziationen von Keimzellstadien unterscheiden (Russel, 1990). Die Anzahl der Stadien ist artspezifisch.

Die Definition der Stadien von I-VI richtet sich nach dem Reifungsgrad der Spermatiden und wurde von Clermont (1963) an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten definiert (**Abb. 3, 4**).

Stadium I: Man findet von basal nach adluminal Spermatogonien Typ A/B, pachytäne Spermatozyten (P), runde Spermatiden (Stufe 1) und elongierte Spermatiden (Stufe 7). In diesem Stadium befinden sich zwei Spermatidentypen, weil die Entwicklung der vorherigen Generation Spermatiden in diesem Stadium noch nicht abgeschlossen ist.

Stadium II zeigt von basal nach adluminal Spermatogonien Typ A/B, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatiden (Stufe 2) und elongierte Spermatiden (Stufe 8). Zusätzlich treten die abgeschnürten Residualkörper der Spermatiden der Stufe 8 auf.

Anschließend werden die reifen Spermatozoen in das Lumen der *Tubuli seminiferi* abgegeben. Daraufhin erfolgt die nächste „Welle“ der Spermatogenese mit dem Eintritt von Spermatozyten des Typs B in die Meiose.

Stadium III weist von basal nach adluminal folgende Keimzelltypen auf: Spermatozyten des Typs A, präleptotäne Spermatozyten (pL), pachytäne Spermatozyten und Spermatozoen (Stufe 3).

Stadium IV umfasst von basal nach adluminal folgende Keimzelltypen: Spermatozyten Typ A, leptotäne Spermatozyten (L), pachytäne Spermatozyten und elongierte Spermatozoen (Stufe 4).

Stadium V: Man findet von basal nach adluminal Spermatozyten Typ A, leptotäne Spermatozyten, pachytäne Spermatozyten und elongierte Spermatozoen (Stufe 5). Nach dem Stadium V durchlaufen die pachytänen Spermatozyten die erste Reifeteilung.

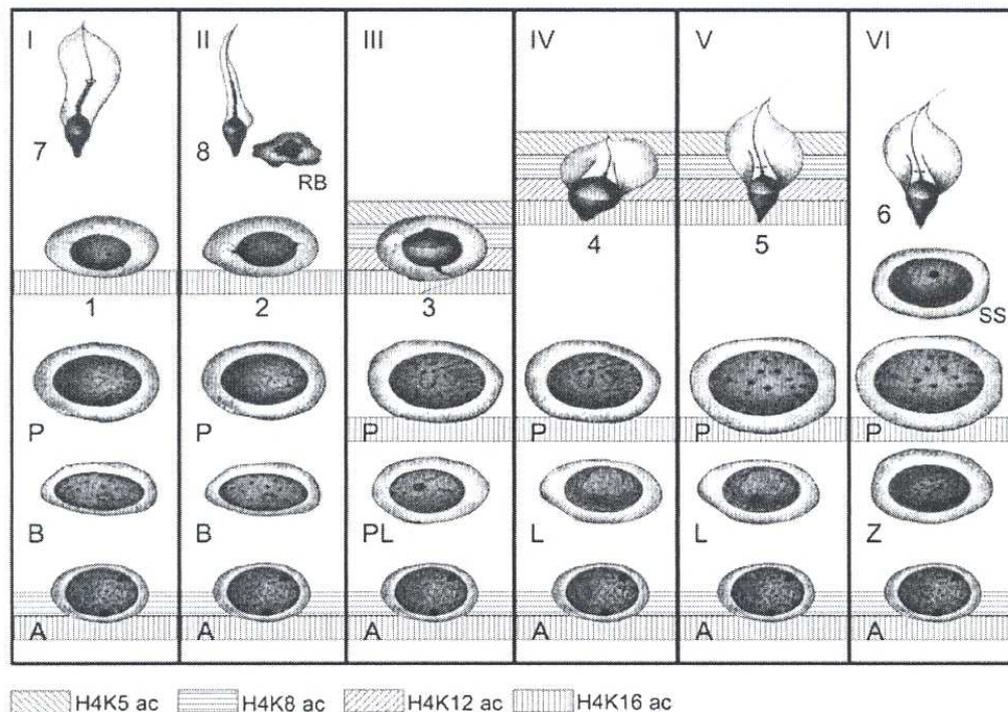


Abb. 3: Stadien der Spermatogenese beim Menschen und Expressionsmuster von den modifizierten Histonen H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac. A = Spermatozyten Typ A, B = Spermatozyten Typ B, PL = präleptotäne Spermatozyten, L = leptotäne Spermatozyten, Z = zygotäne Spermatozyten, P = pachytäne Spermatozyten, SS = Sekundäre Spermatozyten, 1-3 = runde Spermatozoen, 4-7 = elongierte Spermatozoen, 8 = reifer Spermatozoon, RB = Residualkörper (Hecht et al., 2009).

Stadium VI zeigt von basal nach adluminal Spermato gonien Typ A, zygotäne Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten, sekundäre Spermatozyten (SII) und elongierte Spermatoziden (Stufe 6). Anschließend erfolgt die zweite Reifeteilung und der Zyklus beginnt von vorne mit Stadium I.

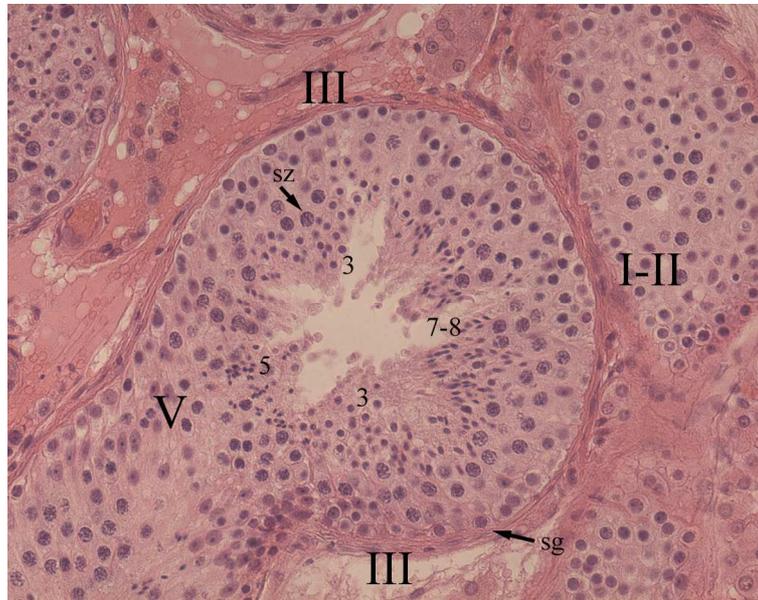


Abb. 4: Stadien der humanen Spermatogenese in einem Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Hodenbiopsie-Schnitt. Die römischen Ziffern markieren die Stadien der Spermatogenese, die arabischen Ziffern die Stufen der Spermatoziden. 3 = runde Spermatoziden, 5 + 7 = elongierte Spermatoziden, 8 = reife Spermatozoen, sz = Spermatozyten, sg = Spermato gonien

2.1.5 Dauer der Spermatogenese

Ein Spermatogenesezyklus dauert 16 Tage und bezeichnet den Zeitraum, innerhalb dessen alle Stadien der Spermatogenese an einem bestimmten Ort des Keimtubulus vorkommen. Des Weiteren benötigt eine Spermato gonie 4,6 Zyklen (74 Tage), um sich zu einem reifen Spermium zu entwickeln und zusätzlich zwölf Tage, um den Nebenhoden zu passieren. Zusammenfassend bedeutet dies, dass von der Teilung einer Stammzelle bis zum Auftauchen des Spermiums im Ejakulat 86 Tage vergehen (Bergmann, 1998).

2.1.6 Störungen der Spermatogenese

Zur Klärung der Frage, ob bei Kinderwunschpatienten eine obstruktive oder nicht-obstruktive Azoospermie vorliegt, wird häufig eine Hodenbiopsie durchgeführt. Die häufigste histologische Diagnose ist die „bunte Atrophie“ (Sigg, 1979), die verschiedene Spermatogenesestörungen (s. u.) in benachbarten Tubuli zeigt.

Ein häufiger Defekt ist das Sertoli-Cell-Only-Syndrom (SCO), bei dem die Keimtubuli nur Sertoli Zellen enthalten (Del Castillo et al., 1974; Holstein et al., 1988).

Weitere Störungen sind Spermatogeneseearreste, bei denen die Ausreifung der Keimzellen in einem bestimmten Stadium stoppt (Spermatogonien, primäre oder sekundäre Spermatozyten, runde Spermatiden)(Holstein et al., 1988). Die Ursachen von Spermatogeneseearresten sind häufig idiopathisch (ca. 30%). Bekannte Ursachen sind Chromosomenanomalien, Mikrodeletionen im Azoospermiefaktor-Lokus (AZF) des Y-Chromosoms und Mutationen im Gen für die zystische Fibrose (CF). Bei Patienten mit einem Spermatidenreifungsarrest wurden Störungen der transkriptionalen Regulationsmechanismen festgestellt (Nieschlag und Behre, 2000).

Die Beurteilung der Spermatogeneseeffektivität wird mit Hilfe verschiedener Score-Verfahren ermittelt (Johnson, 1970; Holstein und Schirren, 1983; Bergmann und Kliesch, 1998). In dieser Studie wird das Verfahren nach Bergmann und Kliesch (1998) eingesetzt, bei dem der prozentuale Anteil der *Tubuli seminiferi* mit elongierten Spermatiden bestimmt wird. Der Score trifft jedoch keine Aussage über die Quantität der Spermatogenese.

2.1.7 Hormonelle Regulation der Spermatogenese

Die hormonelle Regulation der Spermatogenese läuft als Kreislauf mit negativer Rückkopplung ab, wobei der Hypothalamus, die Hypophyse und der Hoden beteiligt sind. Spezielle Neurone des Hypothalamus sondern das Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) ab, welches wiederum die Produktion vom Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) im Adenohypophysenvorderlappen stimuliert. Die pulsatile Ausschüttung von GnRH (4-6 Pulse in 6 Std.) führt zu Bildung von LH mit Schwankungen im Blut von ca. 20minütigen Intervallen (Wennemuth und Aumüller, 1998). Nimmt die GnRH-Sekretion ab, führt dies zur Bildung von FSH.

LH stimuliert die Produktion von Testosteron in den Leydig Zellen der Samenkanälchen des Hodens. Testosteron wiederum wirkt sich negativ auf die Sekretion von Hormonen im Hypothalamus und der Adenohypophyse aus.

FSH bewirkt die Bildung von Androgen-bindendem Protein (ABP), welches den Transport von Testosteron von Sertoli Zelle zu Sertoli Zelle unterstützt. Zudem wird die Produktion von Aktivin und Inhibin angeregt, welche die Hormonabgabe im Hypothalamus und in der Adenohypophyse beeinflussen (Nieschlag und Behre, 2000; Holdcraft und Braun, 2004; Brehm und Steger, 2005).

2.2 Ejakulat

Die Samenflüssigkeit des Mannes ist schwach alkalisch (pH 7,3-7,8), um die Beweglichkeit der Spermien im sauren Milieu der Scheide zu gewährleisten. Die Spermien sind im Seminalplasma suspendiert, welches sich aus Sekreten der Cowperschen Drüsen (5%), der Prostata (30%) und den Bläschendrüsen (60%) zusammensetzt. Das Seminalplasma bildet den Hauptteil des Ejakulates, während der zelluläre Anteil nur etwa 5% ausmacht. Nach der Ejakulation sind die Spermien nicht gleichmäßig im Seminalplasma verteilt, weil sich dieses aus verschiedenen Drüsen zusammensetzt. Eine gleichmäßige Verteilung erfolgt erst nach Verflüssigung bei Raumtemperatur nach 15-20 Minuten. (Henkel, 1998).

2.2.1 Zelluläre Bestandteile des Ejakulats

2.2.1.1 Spermatozoen

Ein reifes Spermatozoon besteht aus Kopf, Mittelstück und Schwanz (Flagellum)(**Abb. 5**). Der Kopf enthält das Erbmaterial, der Schwanz dient der Fortbewegung und das Mittelstück versorgt den Schwanz durch Mitochondrien mit Energie. Das Spermatozoon hat die Aufgabe, die weibliche Eizelle zu befruchten. Dabei muss es die Distanz von Vagina zum Ovidukt, sowie physiologische Barrieren (z. B. die *Zona pellucida* der Eizelle) überwinden. Deswegen besitzt das Spermium im Akrosom Enzyme, mit der die Penetration von *Cumulus oophorus* und *Zona pellucida* ermöglicht werden. Des Weiteren besitzt das Spermium am Kopf Rezeptoren für eine Bindung an die *Zona pellucida* und das Oolemma (Henkel, 1998).

Der Kopf des Spermatozoon ist etwa $3\mu\text{m}$ breit und $5\mu\text{m}$ lang. Der Zellkern enthält $1,35\text{pg}$ DNA. Die DNA ist auf Grund der Transportfunktion des Spermatozoon hoch kondensiert. Um dies zu erreichen werden die für somatische Zellkerne typischen Histone gegen Protamine ausgetauscht. Protamine enthalten einen hohen Anteil an Cystein, welches über die Ausbildung von Disulfidbrücken den Kern stabilisiert (Henkel, 1998).

Das Flagellum ist $50\text{-}60\mu\text{m}$ lang. Es wird von dem Axonem durchzogen, welches Tubuli mit einer $9 \times 2 + 2$ Struktur besitzt. Dabei werden die beiden Zentraltubuli von neun peripher gelegenen Doppeltubuli umschlossen, die aus α - und β -Tubulin bestehen. Zusätzlich sind die Doppeltubuli außen von neun Mantelfasern umgeben, die möglicherweise das Flagellum vor dem Abbrechen schützen.

Die Bewegung des Flagellums wird durch eine Konformationsänderung der Dyneinarme der Doppeltubuli erreicht, bei der die Tubuli aneinander vorbeigleiten. Chemische Energie wird dabei von Adenosintriphosphat (ATP) bereit gestellt und in kinetische Energie umgewandelt. Das Gleiten der Tubuli führt zu einer Krümmung des Flagellums und letztendlich zu einem Ruderschlag (Henkel, 1998).

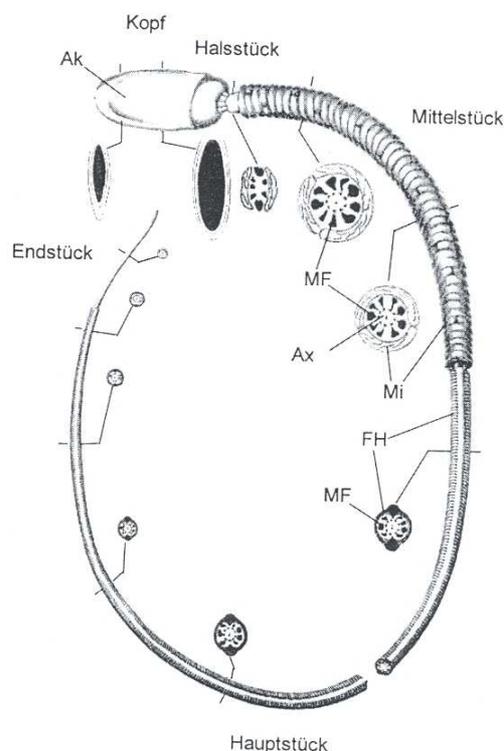


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Säugerspermatozoons. Ak = Akrosom, Ax = Axonem, FH = Fibröse Hülle, MF = Mantelfasern, Mi = Mitochondrien (Fawcett, 1975).

2.2.1.2 Weitere Zellen

Neben den reifen Spermatozoen können sich im Ejakulat weitere Zellen in geringer Anzahl befinden. Dazu gehören verschiedene Stadien der Spermatogenese, die mit den Spermien aus dem Hoden heraus transportiert werden. Am häufigsten sind dabei Spermatiden, die noch kein Akrosom oder Flagellum ausgebildet haben. Sie können bis zu 10% des Gesamtejakulates bei einem fertilen Mann einnehmen.

Um diese unreifen Spermatiden von Leukozyten unterscheiden zu können, wird eine spezifische Färbung durchgeführt, die sogenannte Peroxidasereaktion. Leukozyten sind ebenfalls immer im Ejakulat zu finden. Die Typen und Anteile bei fertilen und infertilen Männern sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Leukozytenanteile im Ejakulat von fertilen und infertilen Männern (verändert nach Wolff, 1995).

Leukozyten Typ	Anteil an den Gesamtleukozyten im Ejakulat	Hauptsächliche Herkunft	Anzahl bei fertilen Männern (Spannweite)	Anzahl bei infertilen Männern (Spannweite)
Gesamt	100%	s. u.	8.970-20.520.000	43.120-104.580.000
Granulozyten	50-60%	Prostata, Bläschendrüsen	6.250-19.950.000	31.787-91.507.000
Makrophagen	20-30%	Epididymis, Rete testis	2.800-997.500	10.395-8.123.750
T-Lymphozyten	2-5%	Epididymis, Rete testis	Nicht nachweisbar-108.666	Nicht nachweisbar-5.142.250
B-Lymphozyten	Sehr geringer Anteil	Epididymis, Rete testis	Nicht nachweisbar-25.200	Nicht nachweisbar-2.964.750

Wenn die Leukozytenkonzentration einen Wert von $1 \times 10^6/\text{ml}$ übersteigt, so bezeichnet man den Befund als Leukozytospermie, welche mit männlicher Infertilität korreliert. Für die Fertilität ist eine geringe Anzahl von Leukozytenprodukten und reaktiven Sauerstoffspezies von Bedeutung. Reaktive Sauerstoffspezies wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hyperoxid-Anion (O_2^-) oder das Hydroxylradikal (OH) sind hochreaktiv und können die Spermatozoenmembran schädigen (Aitken et al., 1989). Darum sollten bei Aufbereitungsmethoden wie z. B. der Swim-up-Technik (s. Methoden) zuerst die intakten Spermatozoen vom den geschädigten, sowie den Leukozyten getrennt werden.

Anschließend können die intakten Spermatozoen vom Seminalplasma getrennt werden (Henkel, 1998).

2.2.2 Seminalplasma

Das Seminalplasma besteht aus Sekret der Cowperschen Drüsen, der Prostata und der Bläschendrüsen. Es dient der Aufrechterhaltung der Osmolarität und des Ionengleichgewichts sowie dem Schutz, Transport und der „Ernährung“ der Spermien. Die Osmolarität und das Ionengleichgewicht werden durch Elektrolyte erreicht, die in ähnlichen Konzentrationen im Blutserum vorhanden sind. Die einzige Ausnahme bildet Kalium, welches in höheren Konzentrationen enthalten ist. Zur „Ernährung“ der Spermien befindet sich Fruktose im Seminalplasma, das aus den Bläschendrüsen stammt. Neben Fruktose kann man die Kohlenhydrate Glucose, Sorbitol, Inositol, Ribose, Fukose und N-Acetyl-Neuraminsäure im Seminalplasma finden. Spermatozoen sind wie somatische Zellen in der Lage, Glykolyse zu betreiben, sowie Glukose oxidativ abzubauen.

Des Weiteren werden von der Prostata und dem Epididymis Glycerinphosphat und Citrat und von der Prostata Cholesterol, Prostaglandine und Zink sezerniert. Zusätzlich befinden sich zahlreiche Aminosäuren im Seminalplasma, wie Glycin, Alanin, Asparaginsäure, Carnitin und Ornithin. Carnitin ist ein Produkt des Epididymis und wurde früher als Nebenhodenmarker verwendet. Heute benutzt man α -Glucosidase, welches vom Nebenhodenepithel sezerniert wird und dessen Konzentration einfacher und kostengünstiger zu bestimmen ist.

Die Proteinkonzentration ist im Seminalplasma etwa genauso hoch wie im Blutserum mit den vorherrschenden Proteinen Seminogelin I und Seminalgelin II, die für die Koagulation des Ejakulats nach der Ejakulation zuständig sind.

Des Weiteren befinden sich die Hormone Testosteron, Estradiol, DHEA (Dehydroepiandrosteron), Cortisol, Prolaktin und FSH (Follikel stimulierendes Hormon) im Seminalplasma (Aumüller und Riva, 1992; Henkel, 1998).

2.3 Chromatinkondensation und Histon-Protamin-Austausch während der Spermatogenese

2.3.1 Histone

In somatischen Zellen kommt das Chromatin in den verschiedenen Stadien des Zellzykluses unterschiedlich stark kondensiert vor. Allerdings weisen alle Stadien die auf Histonen basierende Chromatinstruktur auf. Die Histone kommen als Nukleosom (bestehend aus den vier Histondimeren H2A, H2B, H3 und H4, die „Kernhistone“) vor, um das die DNA gewickelt ist (1,65 Windungen entspricht 146 bp = Basenpaare). Das Linkerhiston H1 stabilisiert die Verbindung zwischen Nukleosom und DNA (Übersichtsartikel: Braun, 2001; Wolfe, 1998).

Während der Chromatinkondensation der Spermatogenese werden zunächst die somatischen Histone H1, H2A, H2B und H3 gegen testisspezifische Subtypen ausgetauscht, die sich nur in wenigen Aminosäuren von den somatischen Typen unterscheiden. Für H4 sind keine testisspezifischen Subtypen bekannt. Der Austausch findet in den pachytänen Spermatozyten statt (Vgl. Übersichtsartikel: Kimmins und Sassone-Corsi, 2005; Koppel et al., 1994; Albig et al., 1995; Gatewood et al., 1990; Steger et al., 1998; Zalensky, 2002; Iguchi et al., 2003; Govin et al., 2004).

Für H1 sind bis jetzt drei testisspezifische Linkerhistone bekannt: H1t, H1t2 und HILS1 (Khochbin, 2001; Iguchi et al., 2003; Martianov et al., 2005). H1t sorgt für eine schwächere Chromatinkondensation und erleichtert damit den späteren Austausch mit anderen Proteinen. H1t-Knockout-Mäuse sind fertil (Fantz et al., 2001), da beim Fehlen dieses Subtyps die Expression von anderen Subtypen mit redundanter Funktion verstärkt wird (Drabent, et al., 2000; Lin et al., 2000, 2004). Zudem wurde festgestellt, dass die Spermatogenese auch nicht beeinträchtigt wird, wenn H1 ein abnormales Verhältnis zu den Kernhistonen aufweist (Lin et al., 2004).

Für H2A und H2B gibt es die hodenspezifischen Subtypen TH2A und TH2B (van Rooijen et al., 1998). Des Weiteren kommen in der Spermatogenese die beiden Typen H2A.X und makroH2A (H2A1.2) vor. Von H2A.X ist bekannt, dass es an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen beteiligt ist und Knockout-Mäuse infertil sind (Ragakou et al., 1998; Celeste et al., 2002; Lewis et al., 2003a), während makroH2A an der Paarung der Sexchromosomen beteiligt ist und nicht bei Tieren vorkommt, die keine Protamine in reifen Spermien besitzen (Hoyer-Fender et al., 2000; Abott et al., 2004).

H3 weist eine testisspezifische (H3t) (Albig et al., 1995; Witt et al., 1996) und mehrere nicht-testisspezifische (z. B. H3.3; Albig et al., 1995) Varianten auf. H3.3 ist vor allem in den transkriptional aktiven Spermatozyten exprimiert (Lewis et al., 2003b).

Für H4 gibt es keine testisspezifischen Subtypen, jedoch wurde ein analoges H4t Gen gefunden, welches in der Proteinstruktur mit dem somatischen H4 übereinstimmt (Wolfe et al., 1989; Drabent et al., 1995).

2.3.2 Transitionsproteine und Protamine

In den Stadien der runden Spermatiden werden die somatischen und testisspezifischen Histone teilweise gegen Transitionsproteine ausgetauscht (Heidaran et al., 1988; Meistrich et al., 1992; Meistrich et al., 2003). Der Austausch der Histone beginnt auf molekularer Ebene mit einer Acetylierung der Lysin-Reste des N-terminalen Bereichs der Histone (Übersichtsartikel: Braun, 2001; Meistrich et al., 1992). Weitere Modifikationen der Kernhistone folgen und Topoisomerase II sorgt gleichzeitig für das aufwinden der DNA-Superhelix, was später auch die Bindung von Protaminen erleichtert (McPherson und Longo, 1993; Marcon und Boissonneault, 2004).

Die Funktion der Transitionsproteine ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird angenommen, dass sie an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen beteiligt sind (Übersichtsartikel: Braun, 2001; Caron et al., 2001). Zudem gelten sie als Vermittlerproteine (*intermediate proteins*) zwischen Histonen und Protaminen (Meistrich et al., 2003).

Im weiteren Verlauf der Spermatogenese (in Spermatiden der Stufen 3-5) bzw. zeitlich parallel erfolgt der Stopp der Transkription (Übersichtsartikel: Steger, 1999; Roux et al., 1988; Lescoat et al., 1993; Prigent et al., 1996; Steger et al., 2000) und der Austausch gegen Protamine, die phosphoryliert sind, welches die Bindung dieser Proteine an die DNA erleichtert. Mit zunehmender Kondensation des Chromatins werden die Protamine jedoch wieder dephosphoryliert (Angelopoulou et al., 2007).

Die Protamine werden längst der DNA gepackt und neutralisieren das Phosphordiester-Rückgrat der DNA (Balhorn, 1982). Des Weiteren werden die Protamine untereinander über Disulfidbrücken an ihren Cysteinresten miteinander verbunden (Balhorn et al., 1991; Ward and Coffey, 1991). Zusätzlich sind die Protamin-DNA-Komplexe in konzentrischen Kreisen in Form einer Doughnut-Struktur angeordnet, die über van-der-Waals-Kräfte gehalten werden (**Abb. 6**) (Ward, 1993).

Mit dem Austausch der Histone durch Protamine wird eine Volumenverringerung um das Zwanzigfache erreicht (Powell et al., 1990; Balhorn et al., 1999).

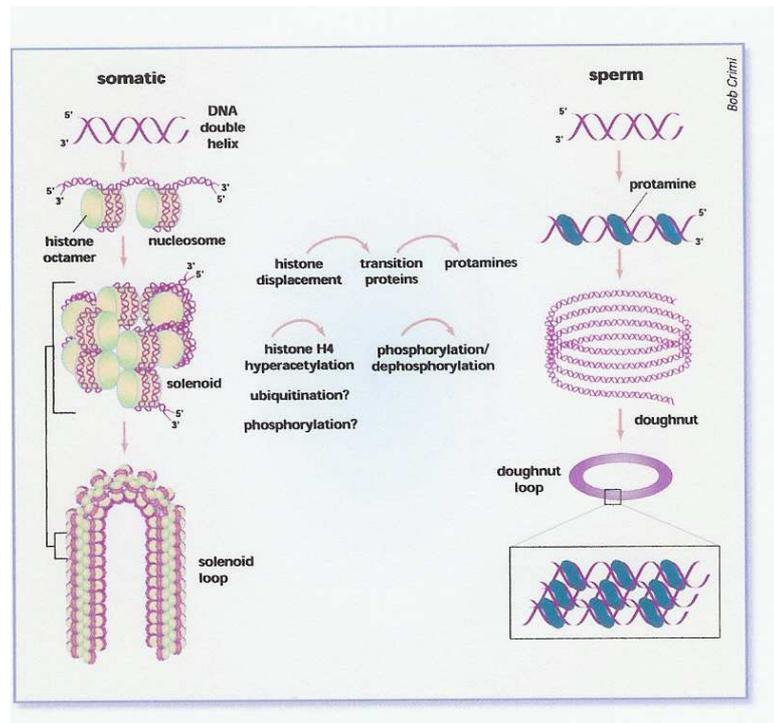


Abb. 6: Modell zur Chromatinkondensation in somatischen Zellen (links) und Spermien von Säugetieren (rechts). In somatischen Zellen ist die DNA um Histon-Oktamere gewunden und zu Solenoiden aufgewickelt. Die Solenoide bilden DNA-Schleifen-Domänen. In Spermienkernen werden die Histone zunächst durch Transitionsproteine und anschließend durch Protamine ersetzt. Der Protamin-DNA-Komplex bildet Doughnut-Strukturen aus. Die Ablösung der Histone von der DNA wird durch posttranslationale Veränderungen begleitet: Histon-Acetylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung. Die Ablösung der Transitionsproteine wird möglicherweise durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung begünstigt (Braun, 2001).

Der Mensch besitzt zwei Protamine (Prm1 und Prm2), deren Anzahl in einem festgelegten Verhältnis zueinander steht (Corzett, 2002; Lewis et al., 2003b; Dadoune, 2003). Das *Prm1*-Gen und das Prm1-Protein kommen bei allen Säugetieren vor, während das *Prm2*-Gen nicht beim Bullen und Eber und das Prm2-Protein nur beim Menschen, allen Primaten, einigen Unpaarhufern (z. B. Pferd, Zebra, Tapir), einigen Hasenartigen (z. B. Kaninchen, Hase), den meisten Nagetieren (z. B. Maus) und Rüsseltieren (z. B. Elefant) vorkommen (Balhorn, 1989; Lee und Cho, 1999; Balhorn, 2007).

Protamine scheinen für die männliche Fertilität eine wichtige Rolle zu spielen, wie zahlreiche Studien zeigen (Balhorn et al., 1988; Belokopytova et al., 1993; Khara et al., 1997; Carrell und Liu, 2001; Steger et al., 2001, 2003; Zhang et al., 2006).

Untersuchungen an Knockout-Mäusen zeigen, dass bereits die Deletion von einem der beiden Protamin-Allele zu männlicher Infertilität führt (Cho et al., 2001). Des Weiteren ist von Bedeutung, dass in runden Spermatisden von fertilen Männern das Verhältnis der Prm1 zu Prm2-mRNA 1:3,2 beträgt und in reifen Spermatozoen 1:1 (Steger et al., 2008). In infertilen Männern wurde dagegen ein Verhältnis von 1:4 in Spermatisden und 1:1,7 in reifen Spermatozoen gefunden (Steger et al., 2008).

Zusätzlich führt ein abnormales Prm1- zu Prm2-Protein Verhältnis bei Männern zu Infertilität (Balhorn et al., 1988; Khara et al., 1997; Carrell and Liu, 2001).

Diese Erkenntnisse werden des Weiteren von Studien unterstützt, die festgestellt haben, dass der Grad der Chromatinkondensation umgekehrt proportional zur Befruchtungsfähigkeit der Spermien ist (Bedford et al., 1973; Carrell et al., 1998).

Der Grund für die drastische Chromatinumstrukturierung in der Spermatogenese ist noch nicht bekannt (Hennig und Ausió, 2003). Möglicherweise kann sich das Spermium schneller fortbewegen oder die Eihülle leichter durchdringen. Zudem ist es denkbar, dass der Spermienkopf so vor physikalischer oder chemischer Zerstörung geschützt wird. Außerdem könnte bezweckt werden, dass bestimmte paternale Gene erst im frühen Embryo exprimiert werden können (Braun, 2001). Zudem können epigenetische Markierungen der väterlichen Gene entfernt werden.

2.4 Genetische Kontrollmechanismen während der Spermatogenese

2.4.1 Transkription

Auf Grund des Protamin-Austausches kommt es in der Spermatogenese während der Chromatinkondensation zu einer zeitlichen Trennung von Transkription und Translation. Deswegen wird ein Gen spätestens in runden Spermatisden exprimiert, das dazugehörige Protein findet man jedoch erst in elongierten Spermatisden (Steger, 1999). Der bedeutendste Transkriptionsfaktor in der Genexpression in haploiden Spermatisden ist der *cAMP-responsive-Element-Modulator (CREM)*. Mäuse, bei denen das *CREM*-Gen defekt ist, sind infertil auf Grund eines Reifungsarrestes in den runden Spermatisden (Blendy et al., 1996; Nantel et al., 1996). Interessanterweise ändert sich die Funktionen des *CREM*-Proteins von Repressoren in Spermatisgonien und Spermatiszyten zu Aktivatoren in Spermatisden. Dies wird durch alternatives Spleißen des *CREM*-Gens erreicht (Delmas et al., 1992; Foulkes et al., 1992; Laoide et al., 1993; Masquillier et al., 1993).

2.4.2 Translation

Die Regulation der Translation in haploiden Spermatischen erfolgt mit Hilfe von mRNA-Bindeproteinen, die an den Poly-A-Schwanz und die 3'-untranslatierte Region (UTR) binden. Während normale Transkripte einen Poly-A-Schwanz von ca. 30 Adenin-Resten besitzen, haben Transkripte in pachytäne Spermatozyten und runden Spermatischen Poly-A-Schwänze von ca. 180 Adenin-Resten. Die Translation der Transkripte beginnt aus diesem Grund mit einer Kürzung des Poly-A-Schwanzes, was durch ein Poly-A-Bindeprotein (PABP) gesteuert wird (Bernstein et al., 1989; Steger, 1999).

Des Weiteren greifen Y-box-Proteine in die Regulation der Translation ein, da sie mit ihrer Funktion als Protein-Repressoren mRNAs postmeiotisch stabil halten. Sie besitzen dazu eine Nukleinsäure-bindende Domäne, die *cold-shock-Domäne* (CSD), die in vielen eukaryotischen Y-box-Proteinen konserviert ist (Übersichtsartikel: Matsumoto und Wolffe, 1998; Übersichtsartikel: Graumann und Marahiel, 1998). Beispiele für Y-box-Proteine sind MSY2 in der Maus (Yang et al., 2005; Yang et al., 2006) und Contrin beim Menschen (Tekur et al., 1999).

2.4.3 Mögliche Funktionen von Spermientranskripten

Auf Grund des Histon-Protamin-Austausches und der damit verbundenen Kondensation des Kernchromatins sind haploide männliche Keimzellen transkriptional inaktiv (Premkumar und Bhargava, 1972; Grunewald et al., 2005). Dennoch befinden sich zahlreiche mRNAs in reifen Spermatozoen (Miller, 2000). Zuerst wurden diese Transkripte für Überbleibsel aus der Spermato-genese gehalten, da zahlreiche mRNAs sowohl im Hoden, als auch in Spermatozoen gefunden wurden (Ostermeier et al., 2002). Doch dann konnte gezeigt werden, dass mRNAs vom Spermium auf die Eizelle übertragen werden (Ostermeier et al., 2004; Lalancette, 2008). Die meisten Spermatozoen-Transkripte verschwinden im 4-Zell-Stadium des Embryos, aber es werden auch einige transkribiert, wie die PLC-zeta-RNA, die die Oozyte durch Calcium-Oszillationen aktiviert (Swann et al., 2006).

Die mRNAs, die in den RNA-Pool der Zygote eingehen, könnten als therapeutische Indikatoren für eine defekte Spermato-genese eingesetzt werden. Zudem wurden mRNAs ermittelt, die nur im Spermium, aber nicht in der Eizelle vorkommen (Ostermeier et al., 2004).

2.5 Epigenetische Kontrollmechanismen während der Spermatogenese

2.5.1 DNA-Methylierung

Die komplette genetische Information ist in der Nukleotidsequenz der DNA verpackt, die in der Gesamtheit als Genom bezeichnet wird. Des Weiteren gibt es das Epigenom (epi = „über“ der DNA), welches Modifikationen bezeichnet, die mit dem Chromatin verknüpft sind. Dabei können sowohl die DNA selbst, als auch die Kernhistone modifiziert sein (Abb. 7).

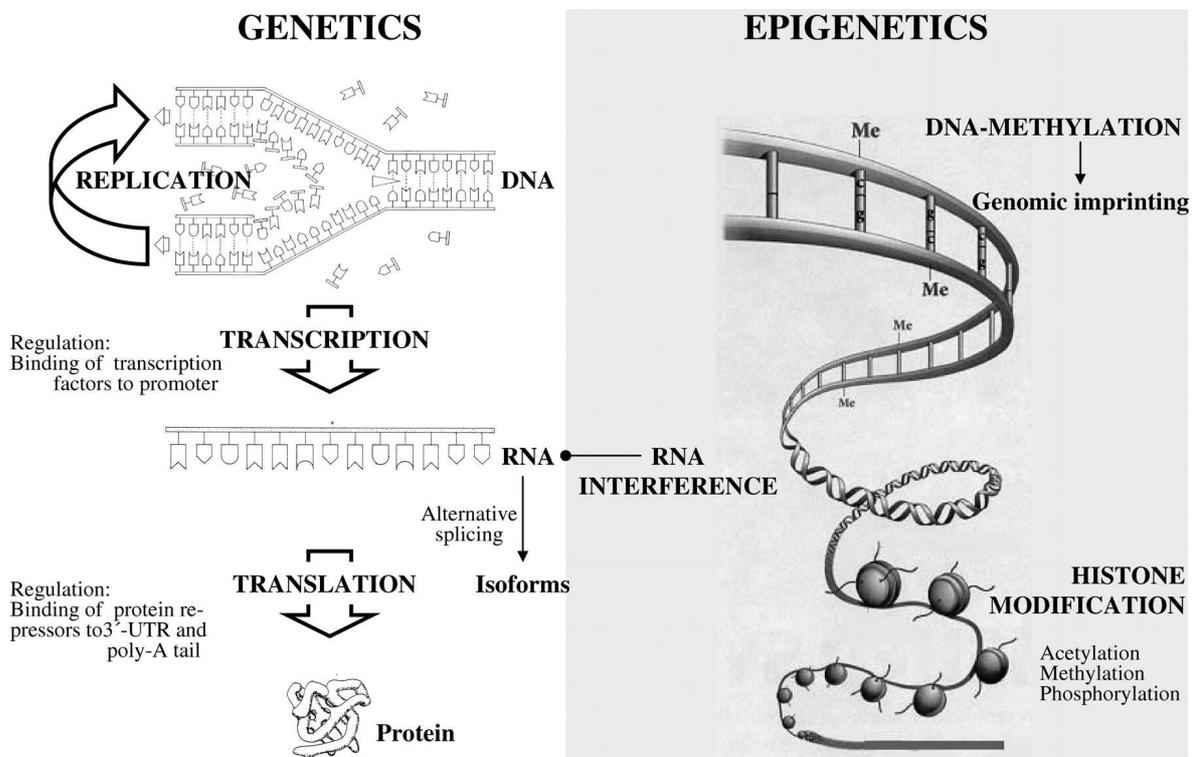


Abb. 7: Übersicht über genetische und epigenetische Prozesse während der Spermatogenese. Die Genregulation erfolgt durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promoter von Genen. Außerdem kann durch die Bindung von Proteinrepressoren an die 3'UTR und den Poly-A-Schwanz des Transkriptes die Translation beeinflusst werden. Durch alternatives Spleißen können zudem verschiedene Isoformen erzielt werden (links). Epigenetische Regulationsmechanismen beinhalten DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und RNA-Interferenz (rechts). Während epigenetische Veränderungen reversibel sind, können genetische Veränderungen nur durch eine Rückmutation aufgehoben werden (Biermann und Steger, 2007).

Die DNA wird an Deoxycytosin-Resten in CpG-reichen Sequenzen methyliert, wobei DNA Methyltransferasen (DNMTs) benötigt werden (Bestor et al., 1988).

Dabei wird eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin auf die 5'-Position eines Cytosins der DNA übertragen. Die DNA-Methylierung kann die Genexpression beeinflussen. Generell steht DNA-Hypomethylierung für transkriptionale Aktivierung während Hypermethylierung mit Repression assoziiert ist (Cedar, 1988; Brandeis et al., 1993).

2.5.2 Histonmodifikationen

Die Kernhistone können verschiedene Modifikationen an speziellen Aminosäureresten in ihrer N-terminalen Region tragen, wie z. B. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung (Allfrey et al., 1964; Bradbury, 1992). Man spricht von einem sogenannten Histon-Code (Strahl und Allis, 2000; Turner, 2002).

Methylierung erfolgt beispielsweise bei Histon 3 an Lysin 9 (**Abb. 8**) in somatischen Zellen durch die Methyltransferasen Suv39h1 und Suv39h2, während im Hoden nur Suv39h2 exprimiert ist (Sims et al., 2003; O'Carroll, 2000). Knockout-Mäuse für die beiden Suv39-Methyltransferasen weisen Defekte in der Meiose auf (Peters et al., 2001).

Phosphorylierung kann man z. B. an Lysin 10 des Histons 3 und an Histon H2AX während der Meiose finden und wird daher mit der Chromatinkondensation in Verbindung gebracht (Prigent und Dimitrov, 2003; Mahadevaiah et al., 2001).

Ubiquitinierung wurde bei der Maus an H2A in Spermatozyten und Spermatiden und bei der Ratte an H2A, H2A.Z, H2B, H3 und TH3 in Spermatiden gefunden (Chen et al., 1998; Baarends et al., 1999). Man vermutet, dass Ubiquitinierung mit der DNA, der Kontrolle des Zellzyklus und dem Histon-Code assoziiert ist (Baarends et al., 1999; Jason et al., 2002).

Acetylierung führt von einem basischen Status der Histone zu einem neutralen, wobei die Histone ihre Affinität zur DNA verlieren und den Protaminen ermöglichen, mit der DNA zu interagieren (Allfrey et al., 1964; Christensen et al., 1984; Grimes and Smart, 1985; Turner, 1991; Davie, 1998). Zudem kann Acetylierung eine wichtige Rolle in der Genregulation einnehmen. In männlichen Keimzellen konnte gezeigt werden, dass Gene spezifisch mit hypo- oder hyperacetylierten Histonen assoziiert sind (Gardiner-Garden et al., 1998).

Hyperacetylierte Histone konnten bereits in den mitotisch aktiven Spermatozyten und in den elongierten Spermatischen, in denen der Histon-Protamin-Austausch statt findet, für die Ratte (Meistrich et al., 1992), die Maus (Hazzouri et al., 2000) und den Menschen (Sonnack et al., 2002) nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine defekte Spermatogenese sowohl mit verfrühter Expression von hyperacetyliertem H4 in pachytänen Spermatozyten, als auch mit reduzierter Expression von hyperacetyliertem H4 in runden Spermatischen in Verbindung steht (Sonnack et al., 2002), da vermutlich der Histon-Protamin-Austausch nicht korrekt erfolgt.

Acetylierung oder Deacetylierung erfolgt durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) bzw. Histon-Deacetylasen (HDACs). HATs übertragen die aktivierte Acetylgruppe des Acetyl-Coenzym A auf die ε-Aminogruppe von Lysinresten in der N-terminalen Region der Kernhistone (**Abb. 8**), wobei eine Amidbindung entsteht. HDACs lösen im Gegensatz dazu die Amidbindung durch Hydrolyse auf (Jenuwein und Allis, 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von männlichen Mäusen mit dem Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitor Trichostatin A (TSA) zu einer reversiblen Infertilität führt, die pachytänen Spermatozytenarrest zeigt (Fenic et al., 2004).

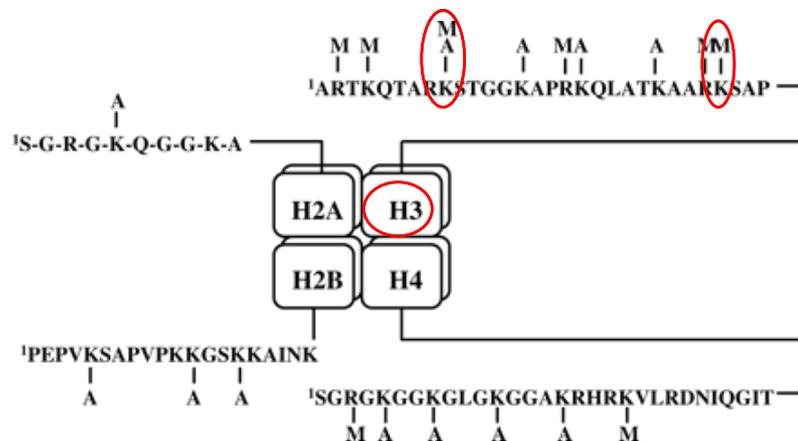


Abb. 8: Bindungsstellen von Histon-Acetylierung (A) und -Methylierung (M) in der N-terminalen Region der vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4. Die rot markierten Felder zeigen die in dieser Arbeit untersuchten Modifikationen (modifiziert nach Biermann und Steger, 2007; nach Davie und Spencer, 1999).

2.5.3 Mögliche Funktionen von Kernhistonen

Bei vielen Säugetieren bleibt ein Teil der DNA an Histone gebunden (Gusse et al., 1986; Bench et al., 1998). Beim Menschen sind dies ca. 15% (Tanphaichitr et al., 1978; Gatewood et al., 1987), während es z. B. bei der Maus nur 2% sind (Balhorn et al., 1977). Diese Differenz zeigt die großen Unterschiede bei Säugetieren. Manche Beuteltierarten besitzen sogar noch 50% der Histone und manche Wirbeltierarten verwenden gar keine Protamine zum Verpacken des paternalen Chromatins (Soon et al., 1997). Daher besteht die Frage, welche Funktion die Histone in Spermien einnehmen.

Acetylierte Histone sind in drei physiologische Prozesse der Zelle involviert und zwar in die Synthese der DNA (Loidl und Grobner, 1987; Parthun et al., 1996), bei der sie ihre Position wechseln, um Transkriptionsfaktoren den Zugang zur DNA-Sequenz zu ermöglichen (Wolfe und Dimitrov, 1993), die Regulation der Genexpression (Jenuwein und Allis, 2001; Felsenfeld und Groudine, 2003; Shahbazian und Grunstein, 2007; Kouzarides et al., 2007) und der Histon-Protamin-Austausch (s. o.). Bei der Winterflunder und dem Karpfen, bei denen kein Histon-Protamin-Austausch statt findet, kommen keine acetylierten Histone vor (Kennedy et al., 1980, 1981).

Des Weiteren sorgen die Resthistone an manchen Stellen des Genoms für eine Chromatinstruktur, die somatische Zellen ähnlich ist und könnten als epigenetische Markierungen für den Nachwuchs dienen. Die Verpackung der DNA in spezielle Nukleohiston- und Nukleoprotamin-Strukturen lassen die Vermutung zu, dass diese Bereiche für eine frühe Transkription in der Zygote markiert werden (Gatewood et al., 1987; Gardiner-Garden et al., 1998; Wykes und Krawetz, 2003). In dem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sich der weibliche und männliche Pronukleus unterscheiden, auch wenn sie sich bereits in einem gemeinsamen Zytoplasma befinden (Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000). Die Unterschiede bestehen unter anderem darin, dass der männliche Pronukleus mit Protaminen und der weibliche mit Histonen verpackt ist. Zusätzlich gibt es unterschiedliche Methylierungen in maternalen und paternalen *imprinted* Regionen, wobei der männliche Pronukleus generell weniger methyliert ist. Außerdem konnte für Mäuse ermittelt werden, dass der paternale Pronukleus 1,65mal größer als der weibliche ist (Liu et al., 2006) und zudem eine 2-4fach höhere Transkriptionsrate besitzt (Wiekowski et al., 1993; Aoki et al., 1997).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kernhistone im Spermienchromatin mit verschiedenen Modifikationen versehen sind, die in die Zygote übertragen werden können (van der Heijden et al., 2006, 2008). Zum Beispiel enthält das paternale Chromatin nach der Keimzellen-Fusion acetyliertes Histon 4 an Lysin 8 (H4K8ac) und an Lysin 12 (H4K12ac), was somit wahrscheinlich vom Spermium auf die Eizelle übertragen wird. Anschließend wird der paternale Pronukleus aktiv und schnell demethyliert und die paternalen Protamine werden gegen maternale Histone ausgetauscht, so dass gewährleistet wird, dass der Embryo mit einem neuen epigenetischen Programm starten kann (Collas und Poccia, 1998; Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000; McLay und Clarke, 2003).

Für Modifikation H3K9ac ist bereits bekannt, dass sie in den Stadien der Spermatozyten bis elongierten Spermatiden in der Spermatogenese der Maus exprimiert wird (Delaval et al., 2007). Des Weiteren wurde sie im paternalen und maternalen Chromatin bis einschließlich des ersten Zellzyklus in der Maus-Zygote gefunden (Santos et al., 2005). Über eine Expression in reifen Spermien ist jedoch nichts bekannt. Ebenso konnte noch nicht gezeigt werden, ob sie mit speziellen Genregionen in Keimzellen assoziiert ist. Für menschliche CD4⁺ T-Zellen wurde ermittelt, dass H3K9ac hauptsächlich in Regionen um den Transkriptionsstart (TSS) lokalisiert ist (Wang et al., 2008). Die Lokalisation am TSS konnte insbesondere für Maus-Myoblasten und embryonale Maus-Fibroblasten gezeigt werden, sowie für putative regulatorische Elemente, die die Promotorregionen im *Igf2r-Cluster* flankieren (Regha et al., 2007; Gurtner et al., 2008). Des Weiteren konnte für somatische Säugetierzellen demonstriert werden, dass H3K9ac mit trimethyliertem Histon 3 an Lysin 4 (H3K4tm) kolokalisiert (Bernstein et al., 2007).

2.6 Der epigenetische Chromatin-Remodeling-Faktor BRDT

Proteine mit Bromodomänen erkennen die Acetylierung von Histonen und sorgen für eine Chromatinkondensation (Dhalluin et al., 1999; Jacobson et al., 2000). Ein Beispiel dafür ist das Protein BRDT (bromodomain testis-specific, Synonyme: FSRG3 und BRD6), welches im Hoden exprimiert ist und zwei Bromodomänen enthält, die den Acetylierungsgrad des Histons H4 erkennen (Pivot-Pajot et al., 2003; Morinière et al., 2009). Ob das *BRDT*-Gen ebenfalls mit modifizierten Histonen assoziiert ist, wurde noch nicht untersucht. Das *BRDT*-Gen und seine Transkripte spielen eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Keimzellen (Jones et al., 1997; Pivot-Pajot et al., 2003; Shang et al., 2004).

Das sieht man z. B. daran, dass Mäuse, die eine Mutation in dem Allel der ersten Bromodomäne besitzen, infertil sind (Shang et al., 2007). Die BRDT mRNA wurde in den Stadien der pachytänen Spermatozyten bis zu Spermatiden gefunden (Haynes et al, 1992; Zheng et al., 2005; Shang et al., 2007). Für den Menschen wurde eine Spleiß-Variante des *BRDT*-Gens in Spermien von fertilen Männern und im embryonalen Hoden gefunden, jedoch nicht im Hoden von azoospermen Männern (Zheng et al., 2005). Generell ist jedoch nicht bekannt, ob sich das BRDT-mRNA-Expressionslevel in Spermatozoen von fertilen und infertilen Männern unterscheidet.

3. Material

3.1 Geräte

Bioanalyser: Agilent 2100; Agilent Technologies, Waldbronn

Brutschrank: Heraeus instruments B15; Hettich, Tuttlingen

Counter: AC-15; Karl Hecht GmbH, Sontheim

Gel-Elektrophorese-Apparatur: Power-Pac Basic; Bio-Rad, München

Gelanalyse-Apparatur und Software: BioDoc-Analyze; Whatman Biometra, Göttingen

Heizblock: VLM LS2; VLM, Leopoldshöhe

Kamera-System: Axio cam HR für Fluoreszenzmikroskopie; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Lichtmikroskop: BH-2; Olympus, Hamburg

Mikroskop: Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

NanoDrop[®] ND-1000, UV/Vis-Spektralphotometer; Peqlab, Erlangen

Photometer; Eppendorf, Hamburg

Scanner: hp psc 2210; Hewlett-Packard GmbH, Böblingen

Schlittenmikrotom: Leica SM 2000 R; Leica, Bensheim

Schüttler: IKA-VIBRAX-VXR; IKA Labortechnik, Staufen

Schüttler: Adams Nutator; Becton, Dickinson, Heidelberg

Thermocycler: iCycler iQ und Software; Bio-Rad, München

Trockenschrank; Memmert, Schwabach

Ultraschall-Gerät: Branson Sonifier 250; Heinemann, Schwäbisch-Gmünd

Ultraschall-Gerät: Sonorex, TK30; Bandelin electronic, Berlin

Ultra-Turrax-Gerät: T8; IKA Labortechnik, Staufen

Vortexer: IKA Genius; Sigma-Aldrich, Steinheim

Vortexer: Reax 2000; Heidolph, Kehlheim

Waage: Mettler AE 240; Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Wasserbad; Julabo, Seelbach

Western-Blot-Apparatur: PowerEase500; Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A

Zentrifuge: MIKRO 22R; Hettich, Tuttlingen

Zentrifuge: Rotana/AP; Hettich, Tuttlingen

3.2 Chemikalien

Aceton; Roth, Karlsruhe

Agarose; Bioline, Luckenwalde

Betaine, PCR Reagent; Sigma-Aldrich, Steinheim

β -Mecaptoethanol; Merck, Darmstadt

Bovines Serumalbumin (BSA); Sigma-Aldrich, Steinheim

Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$); Sigma-Aldrich, Steinheim

Chloroform; Roth, Karlsruhe

Brilliant Blue G Solution; Sigma-Aldrich, Steinheim

Diethylpyrocarbonat (DEPC); Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt

Dithiothreitol (DTT); Roth, Karlsruhe

Eosin; Holborn und Söhne GmbH und Co. KG, Leipzig

Essigsäure; Merck, Darmstadt

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Sigma-Aldrich, Steinheim

Ethanol 70%; Otto Fischer GmbH, Saarbrücken

Ethanol 96%; Otto Fischer GmbH, Saarbrücken

Ethanol 100%; Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland

Formaldehyd 37%; Roth, Karlsruhe und Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz

Glycin; Roth, Karlsruhe

Glycerol; Sigma-Aldrich, Steinheim

Glucose (wasserfrei); Merck, Darmstadt

HEPES; Sigma-Aldrich, Steinheim

Hämalaun nach Mayer; Merck, Darmstadt

Hämatoxylin; Holborn und Söhne GmbH und Co. KG, Leipzig

Humanes Serumalbumin (HSA), 20%, salzarm; CSL Behring, Marburg

Kaisers Glyceringelatine; Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid (KCl); Sigma-Aldrich, Steinheim

Kaliumphosphat, einbasisch (KH_2PO_4); Sigma-Aldrich, Steinheim

Methanol; Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim

Methylbenzoat; Roth, Karlsruhe

Magnesiumsulfathydrat ($\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$); Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumacetat-Lösung 3M (pH 5,2); AppliChem, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl); Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS); Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3); Merck, Darmstadt
Natrium-Lactat; Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Pyruvat (Brenztraubensäure); Sigma-Aldrich, Steinheim
Natronlauge; Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd; Merck, Darmstadt
Paraplast; Roth, Karlsruhe
Phenol; Roth, Karlsruhe
Phenolrot; Sigma-Aldrich, Steinheim
Pikrinsäure; Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure; Merck, Darmstadt
Schorr'sche Farblösung; Merck, Darmstadt
Sucrose, Alpha bulk; Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, Connecticut
U.S.A
Tris-Acetat; Roth, Karlsruhe
Triton-X-100; Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma[®] base; Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma[®] hypochloride; Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween[®] 20; Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol; Merck, Darmstadt

3.3 Lösungen, Medien, Puffer

Anilinblau-Lösung: 5g Anilinblau in 100ml 4%iger Essigsäure lösen, pH-Wert 3,5 mit 1M NAOH-Lösung einstellen, filtrieren

BSA-Blockpuffer (5%ig): 10g BSA in 200ml 1x Tris-HCl-Puffer (Aliquotieren)

Bouin'sche Lösung: 11,25ml Pikrinsäure (25g in 1l heißem Aqua bidest. lösen und mindestens 24h stehen lassen. Anschließend filtrieren und in dunkler Flasche lagern. Stopfen der Flasche nach dem Öffnen gut reinigen! Explosionsgefahr!); 3,75ml 37%iges Formalin; 0,75ml Essigsäure, Lösung gekühlt bis zu 12h haltbar

Citratpuffer: 3,5ml Stammlösung A + 20,5ml Stammlösung B auf 250ml Aqua bidest., pH 6,0; Stammlösung A: 21,01g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Merck, Nr. 244, in 1l Aqua bidest., Stammlösung B: 29,41g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Nr. 6448, in 1l Aqua bidest.

Coomassie Brilliant Blau-Entfärbelösung: 455ml Methanol, 455ml Aqua bidest., 90ml Essigsäure

Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung : 2,5g Brilliant Blue, 455ml Methanol, 455ml Aqua bidest., 90ml Essigsäure

Decondensing Mix: 25mM DTT; 0,2% Triton-X-100; 200IU/ml Heparin, Auffüllen mit PBS auf 100ml

DEPC-Wasser: 0,5%ige (v/v) DEPC-Lösung in sterilem Wasser über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend autoklavieren. DEPC zerfällt dabei zu CO₂ und Ethanol.

DNA loading buffer (5x), blue; Biotec, Luckenwalde

Eosin-Gebrauchslösung: 1 Teil Eosin-Stammlösung und 1 Teil Ringer-Lösung

Eosin-Stammlösung: 1g Eosin auf 100ml Ringer-Lösung

Glutaraldehyd-Lösung: 4 PBS-Tabletten (Dulbecco) auf 400ml Aqua bidest. und 55ml 25%iges Glutaraldehyd

HFT-Puffer (nach Quinn et al., 1985) mit HSA: Stock 1l: 5,931g NaCl; 0,350g KCl; 0,301g CaCl₂+2H₂O; 0,050g MgSO₄+7H₂O und 0,050g KH₂PO₄ gut vermischen, 2,100g NaHCO₃; 0,500g Glucose (wasserfrei); 0,036ml Na-Pyruvat; 3,9982g Na-Lactat und 5,206g HEPES hinzufügen, am Ende 0,005g Phenolrot hinzugeben.
Die Osmolarität muss auf 280mOsmol eingestellt werden. Beispiel: Ist-Wert = 300 mOsmol, Volumen 1L; 300-280 = 20; 20 = 7,14% von 280; 7,14% von 1l = 71,4ml -> 71,4ml Aqua bidest. hinzufügen; steril filtrieren, vor Arbeitsbeginn 2% HSA (10mg/ml) hinzufügen

Immobilisierungslösung für Spermatozoen (Gießener Ansatz): 10% NaCl-Lösung

Histonextraktions-Lysispuffer: 0,605g Tris; 2,6g NaHSO₃; 5ml Triton-X-100; 1,02g MgCl₂; 43g Sucrose, mit Aqua bidest. auf 500ml auffüllen, auf pH 6,5 einstellen

NTB-Puffer (5x) (für APAAP-Methode): 30,2g Trizma base; 14,6g NaCl; in 500ml Aqua bidest.

Paraformaldehyd (4%ig): 4g Paraformaldehyd in 100ml PBS, pH 7, lösen bei 70°C

PBS (phosphate buffered saline)(10x): 1,3M NaCl; 70mM NaHPO₄; 30mM NaH₂PO₄

Ringer-Lösung; Clintec Salvia, Homburg/Saar

Sample Buffer; Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A

Sperm Preparation Medium; Medi-Cult, Jyllinge, Dänemark

TAE-Puffer (10x): 2M Tris/Acetat pH 7,7; 100mM EDTA pH 7,7

Tris-EDTA-Puffer (pH 7,4): 0,242g Tris; 0,946g EDTA; mit Aqua bidest. auf 70ml auffüllen

Tris-HCl-Puffer (10x): 121,1g Tris-HCl; 58,4g NaCl; in 1l Aqua bidest. lösen, pH 7,4

Tris-HCl-Puffer (1x): 100ml 10x Tris-HCl-Puffer; 900ml Aqua bidest.; 5ml Triton-X-100

Tris-Waschpuffer für APAAP-Methode beim Western Blot: Tris-Stammlösung: 60,57g Trizma base auf 500ml Aqua bidest.; 50ml Tris-Stammlösung; 4,25g NaCl; 0,5ml Triton X-100; in 500ml Aqua bidest.

Western Blot-Laufpuffer: NuPage[®] MES (3-188kDa) oder MOPS (14-191kDa); Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.

Western Blot-Transferpuffer: 50ml NuPage[®] Transfer Buffer (20x), 1ml NuPage[®] Antioxidant; Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.; 200ml Methanol, 749ml Aqua bidest.

3.4 Molekularbiologische Reagenzien und fertige Reagenzienansätze (Kits)

α -Chymotrypsin; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Agarose Beads; Calbiochem., La Jolla, CA, U.S.A

Agilent RNA 6000 Nano Kit; Agilent, Waldbronn

BCA Protein Assay Reagent; Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A

BICP/NBT Phosphate Substrate (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat /Nitrotetrazoliumblausäurechlorid); KPL, Gaithersburg, MD, USA

Bradford Reagenz: 100mg Coomassie Blue G250, 50ml 95%iger Ethanol, 100ml 85%ige Phosphorsäure, Auffüllen mit Aqua bidest. auf 1l, Filterung durch Whatman No. 1 Filterpapier, Lagern bei Raumtemperatur; alternativ: Bio-Rad Protein Assay-Lösung; Bio-Rad, München

Chromatin Immunoprecipitation ChIP Assay Kit; Millipore/upstate, Temecula

Magna ChIP[™] G Chromatin Immunoprecipitation Kit; Millipore/upstate Temecula

Diaminobenzidin (DAB) Chromogen System; Dako, Carpinteria, CA, U.S.A

DNA-Größenstandard Hyper Ladder IV; Bioline, Luckenwalde

DNA Purification Kit 250, QIAquick; Qiagen, Hilden

DNase I; Roche, Mannheim

Ficoll[®]; Sigma-Aldrich, Steinheim

GE Healthcare Amersham ECL[™] Blocking Agent (1,5g in 25ml PBS); Ge Healthcare, Buckinghamshire, UK

GelRed™ (10,000x in water); Biotium, Hayward CA, U.S.A

Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®; ratiopharm, Ulm

illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit; GE Healthcare,
Buckinghamshire, UK

NucleoSpin® Tissue Kit; Macherey-Nagel, Düren

Oligo(dT)-Primer; Promega, Madison, WI, U.S.A

Omniscript® RT Kit (200) zur c-DNA-Synthese; Qiagen, Hilden

Protease Inhibitoren-Tabletten complete Mini EDTA-free (1mM

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1µg/ml Aprotinin und 1µg/ml Pepstatin A);
Roche, Mannheim

Protein-Größenstandard SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard; Invitrogen, Carlsbad,
CA, U.S.A

Reducing Agent; Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A

RNA-Größenstandard RNA 6000 Ladder; Ambion, Inc., Austin, TX, U.S.A

RNeasy® Plus Mini Kit (50); Qiagen, Hilden

Sensiscript® RT Kit (200) zur c-DNA-Synthese; Qiagen, Hilden

iQ™ Sybr® Green Supermix; Bio-Rad, München

Taq PCR Core Kit (1000); Qiagen, Hilden

Vectastain® ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A

WGA2-50RNX Genome Plex Complete Whole Genome Amplifikation (WGA) Kit;
Sigma, Steinheim

Genome Plex WGA Reamplification Kit; Sigma, Steinheim

3.5 Antikörper

- Rabbit polyclonal to Histone H3 - ChIP Grade (ab1791, abcam, Cambridge)
Verdünnung: ChIP 2µg auf 10⁶ Zellen (4µl)
- Rabbit polyclonal to Histon 3 (acetyl K9) - ChIP Grade (ab 4441, abcam, Cambridge), Verdünnung: Immunhistochemie 1:20, ChIP 2µg auf 10⁶ Zellen (1µl),
Western Blot 1:200
- Rabbit Control IgG – ChIP Grade (ab46540, abcam, Cambridge), Verdünnung:
Western Blot 1: 4000 , ChIP 2µg auf 10⁶ Zellen (1µl)
- Mouse monoclonal to Histone H3 (di methyl K9)- ChIP Grade (ab1220, abcam, Cambridge), Verdünnung: ChIP 2µg auf 10⁶ Zellen (2µl)

- ChIP Ab+ Trimethyl- Histone H3 (Lys9), rabbit, polyclonal (17-625, Millipore, Temecula, CA, U.S.A), Verdünnung: ChIP 2µg auf 10⁶ Zellen (4µl)
- ChIP Ab+ Trimethyl- Histone H3 (Lys27), rabbit polyclonal (17-622, Millipore, Temecula, CA, U.S.A), Verdünnung: ChIP 2µg auf 10⁶ Zellen (4µl)
- Polyclonal Goat anti rabbit, biotinylated (E0432, Dako, Glostrup, Dänemark), Verdünnung: Immunhistochemie 1:100
- Monoclonal Mouse anti rabbit (MR12/53, Dako, Glostrup, Dänemark), Verdünnung: Western Blot 1: 1000
- Polyclonal Rabbit anti mouse (Z0259, Dako, Glostrup, Dänemark), Verdünnung: Western Blot 1: 250
- APAAP, mouse monoclonal (D0651, Dako, Glostrup, Dänemark), Verdünnung: Western Blot 1:500

3.6 Primer

Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) hergestellt.

Tab. 2: Primerpaare zur Untersuchung von H3K9ac-Bindungsstellen im Genom mittels ChIP und semiquantitativer oder real time PCR (TSS = Transkriptionsstart).

Name (Accession-Nummer)	Primer-Sequenz 5'-3'	Produktlänge (bp)	Lokalisation im Bereich des Gens
FLNA-F (NM001110556)	CCT AGG TGC CTG CGA CTT TA	104	kodierende Region (2. Exon, 3,3kb <i>downstream</i> vom TSS)
FLNA-R (NM001110556)	CCC CAG AGT GGG AGC TAC T	104	kodierende Region (2. Exon, 3,3kb <i>downstream</i> vom TSS)
PLXNA3-F (NM017514)	GAC TCC CAC ACA CCG TCT CT	136	kodierende Region (zwischen dem 1. und 2. Exon, 1,8kb <i>downstream</i> vom TSS)
PLXNA3-R (NM017514)	ACC ACG AAG GCA CGG AAG	136	kodierende Region (zwischen dem 1. und 2. Exon, 1,8kb <i>downstream</i> vom TSS)
CTSD-F (NM001909)	CAG CCC TCC AGC CTT CTG	147	kodierende Region (1. Exon, direkt hinter dem TSS)
CTSD-R (NM001909)	GAG CGC GAA AGT CAC CAC	147	kodierende Region (1. Exon, direkt hinter dem TSS)
G6PD-F (NM000402)	TGA CCT CCG TGC TAT TCC TC	163	Promotor (1,2kb <i>upstream</i> vom TSS)
G6PD-R (NM000402)	AAT TCT TCG GAA ATG CCT CA	163	Promotor (1,2kb <i>upstream</i> vom TSS)
CRAT-F (NM000755)	ATT TAG ACA CCA CGG GCA GT	154	Promotor (1,4kb <i>upstream</i> vom TSS)

CRAT-R (NM000755)	TAG TCG CTG CTT AGG GGA TG	154	Promotor (1,4kb <i>upstream</i> vom TSS)
SH3GLB2-F (NM020145)	GAG CCC AGC CTG TGA CTT	143	kodierende Region (zwischen dem 4. und 5. Exon, 15,7kb <i>downstream</i> vom TSS)
SH3GLB2-R (NM020145)	GAC TCC AAC CAC CTG GAG AT	143	kodierende Region (zwischen dem 4. und 5. Exon, 15,7kb <i>downstream</i> vom TSS)
MCF2L-F (NM001112732)	GCC AAT AGC ATG TGT GGA GA	158	Promotor (1,6kb <i>upstream</i> vom TSS)
MCF2L-R (NM001112732)	CTG GGA TGT TGA ATG TGC TG	158	Promotor (1,6kb <i>upstream</i> vom TSS)
TH-F (NM199292)	CTG CGA ACC AAG GGG AAC	151	0,5kb hinter dem letzten Exon
TH-R (NM199292)	CCA GGG GCA TCT TAC AGA CT	151	0,5kb hinter dem letzten Exon
SOX2up-F (NM003106)	ATC GCC AGC CAC AGT TAG TT	163	3kb <i>upstream</i> vom TSS
SOX2-up-R (NM003106)	GGT TAA AGG GGT TGG CTA GG	163	3kb <i>upstream</i> vom TSS
SOX2p-F (NM003106)	GCC AAA GAG CTG AGT TGG AC	153	Promotor (0,8kb <i>upstream</i> vom TSS)
SOX2p-R (NM003106)	CCC AAA CCT CTG TCC TCA AA	153	Promotor (0,8kb <i>upstream</i> vom TSS)
SOX2cr-F (NM003106)	AGT CTC CAA GCG ACG AAA AA	141	kodierende Region (1. Exon, 1,8kb <i>downstream</i> vom TSS)
SOX2cr-R (NM003106)	GCA AGA AGC CTC TCC TTG AA	141	kodierende Region (1. Exon, 1,8kb <i>downstream</i> vom TSS)
EVX1up-F (NM001989)	GCC AGA CCA CGC TTA TTG TT	159	3,3kb <i>upstream</i> vom TSS
EVX1up-R (NM001989)	GAA GGG AGA GAG CGA GGA GT	159	3,3kb <i>upstream</i> vom TSS
EVX1p-F (NM001989)	GAC AGG TAC CAC TGC CCC TA	125	Promotor (0,9kb <i>upstream</i> vom TSS)
EVX1p-R (NM001989)	TAG CTT TCA CCG CGC TAT TT	125	Promotor (0,9kb <i>upstream</i> vom TSS)
EVX1cr-F (NM001989)	GAC TTC ACC TGT GCC TCC AC	128	kodierende Region (3.Exon, 3,8kb <i>downstream</i> vom TSS)
EVX1cr-R (NM001989)	GCG GCC CCT TAT CTA GTG A	128	kodierende Region (3.Exon, 3,8kb <i>downstream</i> vom TSS)
KLF4up-F (NM004235)	AAG TGG TGA GTT TCC CAT GC	121	2,8kb <i>upstream</i> vom TSS
KLF4up-R (NM004235)	CTT TTC AAA CGG AGG AAC CA	121	2,8kb <i>upstream</i> vom TSS
KLF4p-F (NM004235)	CCT CCT CTC CAC ACC CCT A	179	Promotor (1kb <i>upstream</i> vom TSS)
KLF4p-R (NM004235)	ATT ATC CGC GTG ACT CAT CC	179	Promotor (1kb <i>upstream</i> vom TSS)
KLF4cr-F (NM004235)	TGC TGC ATA CTT TGA CAA GGA	139	kodierende Region (5. Exon, 4,3kb <i>downstream</i> vom TSS)
KLF4cr-R (NM004235)	TTG CAC ATC TGA CAA GGA	139	kodierende Region (5. Exon, 4,3kb <i>downstream</i> vom TSS)
INHAup-F (NM002191)	CTC CCA AAG TGC TGG GAT TA	162	3,2kb <i>upstream</i> vom TSS

INHAp-R (NM002191)	CAC GCA CAC AAA AAC TTG CT	162	3,2kb <i>upstream</i> vom TSS
INHAp-F (NM002191)	CTG ATG ACA CAG CTG GAG GA	187	Promotor (0,5kb <i>upstream</i> vom TSS)
INHAp-R (NM002191)	AAG TGC ATC ACC CCT CAG AC	187	Promotor (0,5kb <i>upstream</i> vom TSS)
INHAIin-F (NM002191)	CCT AAG GGA GAC TGC TGC AC	129	0,3kb hinter dem letzten Exon
INHAIin-R (NM002191)	AGT CTC TGG CCA GGC TAC AA	129	0,3kb hinter dem letzten Exon
IL3up-F (NM000588)	ATC CCC CTC TTT CCT TCA AA	180	3,2kb <i>upstream</i> vom TSS
IL3up-R (NM000588)	GCA GGG TGA GGA TGA GAT GT	180	3,2kb <i>upstream</i> vom TSS
IL3p-F (NM000588)	ATC CCC TCT CTG CAA ACC TT	154	Promotor (1kb <i>upstream</i> vom TSS)
IL3p-R (NM000588)	AAG GAG AGC AAC TCC CTG GT	154	Promotor (1kb <i>upstream</i> vom TSS)
IL3in-F (NM000588)	CCT CAC CCC AAC CAAGAG TA	178	0,3kb hinter dem letzten Exon
IL3in-R (NM000588)	GCT GCA GTT TCT GGA AGG AC	178	0,3kb hinter dem letzten Exon
FAM50Aup-F (NM004699)	AGT CAC ATT TCC CGT GAA GG	127	4,9kb <i>upstream</i> vom TSS
FAM50Aup-R (NM004699)	GTT CCC CTC CAC ATC ACA TC	127	4,9kb <i>upstream</i> vom TSS
FAM50Ap-F (NM004699)	AAG TGA GCC AAG CAG AAG GA	131	Promotor (0,9kb <i>upstream</i> vom TSS)
FAM50Ap-R (NM004699)	ACA CTA GAG GGT GGG GAG GG	131	Promotor (0,9kb <i>upstream</i> vom TSS)
FAM50Acr-F (NM004699)	CCC TGA AAA GAA GTG GGA CA	144	kodierende Region (12. Exon, 6,1kb <i>downstream</i> vom TSS)
FAM50Acr-R (NM004699)	TGC TCA GCG GAT CTA GTG TG	144	kodierende Region (12. Exon, 6,1kb <i>downstream</i> vom TSS)
STK11IPup-F (NM052902)	CTC CCT TGC TGT GGA TCA TT	392	5,6kb <i>upstream</i> vom TSS
STK11IPup-R (NM052902)	AAG CCA TGG AAC CAT TTG AG	392	5,6kb <i>upstream</i> vom TSS
STK11IPpF (NM052902)	CCT TTT CGA TTC GTT TGC AT	175	Promotor (0,2kb <i>upstream</i> vom TSS)
STK11IPp-R (NM052902)	TGG TCA GAC ATA CCG AAC CTC	175	Promotor (0,2kb <i>upstream</i> vom TSS)
STK11IPcr-F (NM052902)	AGG TAA AGG AAG CCG CAA AT	382	15kb <i>downstream</i> vom TSS, Peak auf dem ENCODE-Array
STK11IPcr-R (NM052902)	GAG CTT CCC TCA CAC TCG AC	382	15kb <i>downstream</i> vom TSS, Peak auf dem ENCODE-Array
GAPDHup-F (NM002046)	CAG AGA GCC TGG TGG AAA AG	207	4,9kb <i>upstream</i> vom TSS
GAPDHup-R (NM002046)	GTG AGG AAC TGG GAG ATC CA	207	4,9kb <i>upstream</i> vom TSS
GAPDHp-F (NM002046)	CGT AGC TCA GGC CTC AAG AC	163	Promotor (0,4kb <i>upstream</i> vom TSS)
GAPDHp-R (NM002046)	AAG AAG ATG CGG CTG ACT GT	163	Promotor (0,4kb <i>upstream</i> vom TSS)

GAPDHcr-F (NM002046)	CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA	332	kodierende Region (7. Exon, 3,5kb <i>downstream</i> vom TSS)
GAPDHcr-R (NM002046)	AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG	332	kodierende Region (7. Exon, 3,5kb <i>downstream</i> vom TSS)

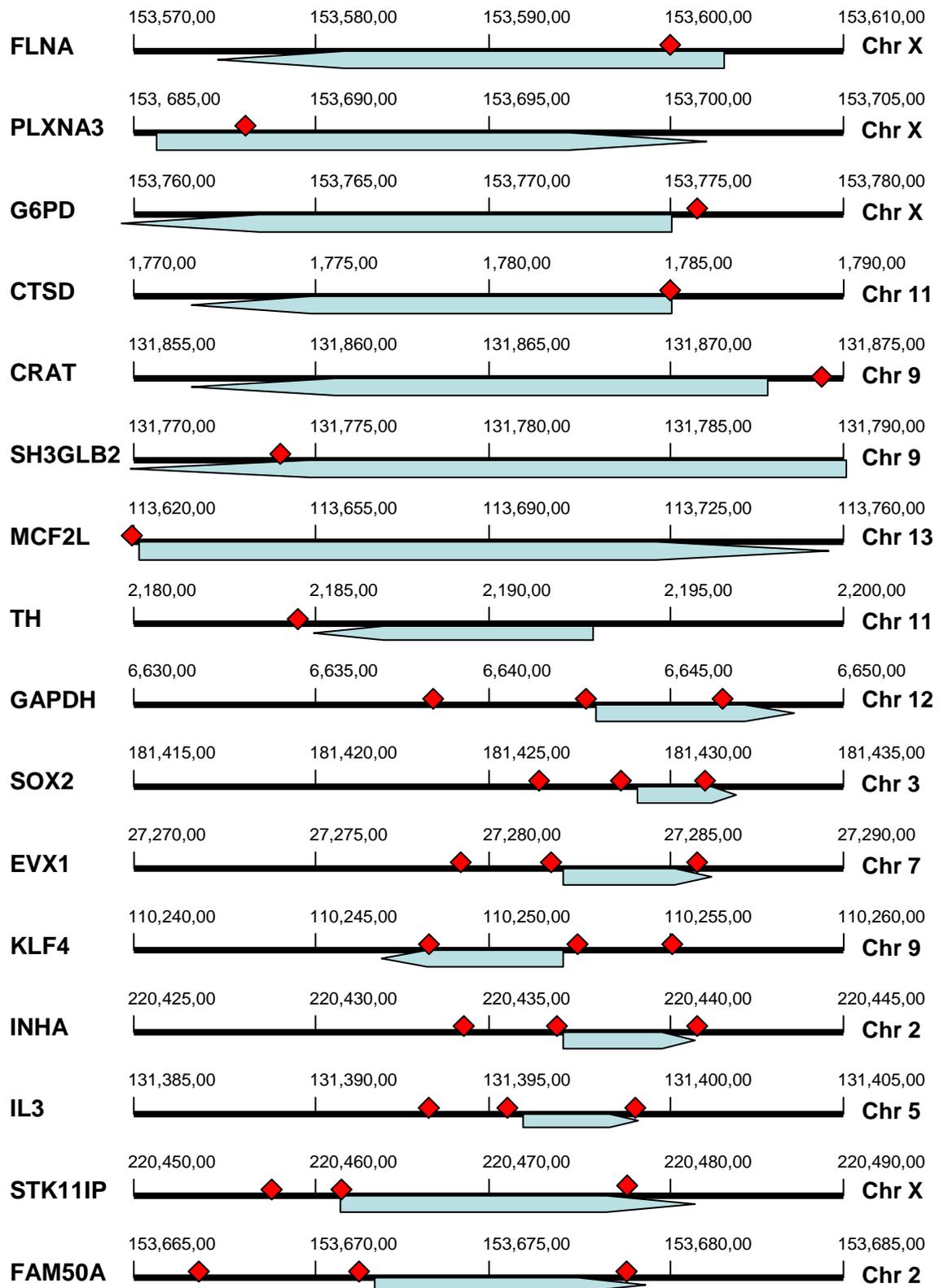


Abb. 9: Übersichtsschema über die genomische Lage der Primer (rot) der Tabelle 2.

Tab. 3: Primerpaare für real time und qualitative PCR zur Untersuchung von Histonmodifikationen, die mit dem *BRDT*-Gen assoziiert sind und Kontroll-Primer für RNA-Experimente. Drei Primerpaare wurden für den Promotor und eines für das erste Exon des *BRDT*-Gens generiert. Die anderen Primerpaare (*ACTB*, *HSPCB*, *GAPD* and *ATP5B*) wurden für Referenzgene ausgewählt. In mRNA-Experimenten wurden cd-45 und c-kit als positive Marker für Leukozyten bzw. testikuläre Keimzellen verwendet (Lambard et al., 2004). F = forward (vorwärts), R = reverse (rückwärts), pr = Promotor, ex = Exon

Name	Accession-Nummer	Primer-Sequenz 5'-3'	Produktlänge (bp)
BRDT-pr1-F	NM001726	GAG GAA TCA GTG TGG GAT CG	119
BRDT-pr1-R	NM001726	TCA GTA GTG CCC CCA TCT TC	119
BRDT-pr2-F	NM001726	GAA GAT GGG GGC ACT ACT GA	176
BRDT-pr2-R	NM001726	GCG AGA CTG CAT CTC AAA CA	176
BRDT-pr3-F	NM001726	GTG CGT TGC TTT CTT GTG AA	105
BRDT-pr3-R	NM001726	TTT CCT GAA GCG GAA GTC TG	105
BRDT-ex-F	(Jones et al., 1997)	AAT GTC TCT GCC AAG TCG ACA A	175
BRDT-ex-R	(Jones et al., 1997)	AGC ATC CAC AGG ACG TTG AAA G	175
ACTB-F	NM001101	TTC CTT CCT GGG CAT GGA GT	90
ACTB-R	NM001101	TAC AGG TCT TTG CGG ATG TC	90
HSPCB-F	NM007355	AAG AGA GCA AGG CAA AGT TTG AG	120
HSPCB-R	NM007355	TGG TCA CAA TGC AGC AAG GT	120
GAPD-F	NM002046	TCT CCT CTG ACT TCA ACA GCG AC	126
GAPD-R	NM002046	CCC TGT TGC TGT AGC CAA ATT C	126
ATP5B-F	NM001686	TCA CCC AGG CTG GTT CAG A	80
ATP5B-R	NM001686	AGT GGC CAG GGT AGG CTG AT	80
CD45-F	(Lambard et al, 2004)	TGC AGA TGC CTA CCT TAA TGC	844
CD45-R	(Lambard et al., 2004)	CAC ATT GCA GCA CTT CCA TT	844
c-kit-F	(Lambard et al., 2004)	AGT ACA TGG ACA TGA AAC CTG G	780
c-kit-R	(Lambard et al., 2004)	GAT TCT GCT CAG ACA TCG TCG	780

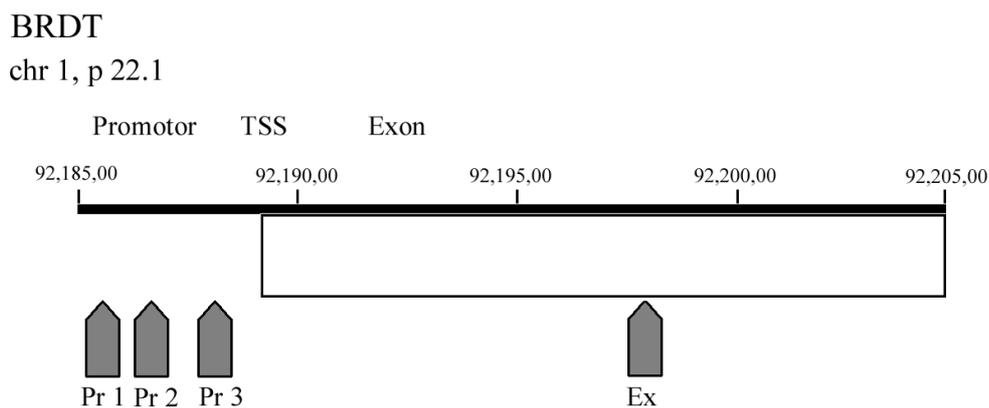


Abb. 10: Ein Abschnitt der genomischen Region des *BRDT*-Gens (Chromosom 1, p 22.1). Primerpaare für diese Arbeit waren im Promotor (Pr 1-3) und im ersten Exon (Ex) des Gens lokalisiert. TSS = Transkriptionsstart

3.7 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der Scientific Research and Development GmbH, Oberursel, durchgeführt.

3.8 Behandlungsmaterial

3.8.1 Ejakulat von fertilen Spendern

Nachdem die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen eine Genehmigung erteilt hatte und die Spender eine Einverständniserklärung unterschrieben hatten, wurden die Proben in der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gesammelt. Alle Proben wurden nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (WHO, 1999) als normal eingestuft (s. Methoden: das Spermogramm und Tab. 8, S.58). Für die morphologische Klassifizierung wurden strenge Kriterien für die Definition als normales Spermium gewählt (Menkveld et al., 1990; Hofmann et al., 1995). Alle Spender wurden daher als fertil eingestuft.

Tab. 4: Übersicht über Spermigramm Daten der verwendeten Ejakulatproben von fertilen Spendern.

Proben-Nr.	Ejakulat-Volumen (ml)	Spermien-Dichte (Mio./ml)	Motilität der Spermien (%) (A-B-C-D) ^b	Morphologie der Spermien (%) N-K-M-S ^c	Anilinblau-Färbung 2+&3+ (%) ^d
1 ^{a,e,f,g,h}	7,6	85	51-9-3-37	16-59-2-46	28
2 ^{a,e,f,g,h}	4,1	76	39-13-4-44	5-83-3-35	12
3 ^{e,f}	4,5	113,5	49-11-8-32	22-75-12-29	9
4 ^{g,f}	4,0	103	5-13-21-61	11-56-73-20	41
5 ^{a,e,f,g}	3,5	26,4	47-20-17-16	26-50-49-14	17
6 ^f	5,0	94,9	51-9-14-26	11-73-53-20	1
7 ^{e,f}	2,5	33	37-23-21-19	15-76-8-40	49
8 ^{a,e,f}	7,5	84	67-12-7-14	18-58-51-8-6	19

^a Mittelwerte von mehreren Ejakulaten

^b nach Kriterien der WHO, s. Methoden (WHO, 1999)

^c N = Normalformen, K = Kopfdefekte, M = Mittelstückdefekte, S = Schwanzdefekte

^d Die Chromatinkondensation gilt als gestört, wenn mind. 25% der Spermatozoen als 2+ oder 3+ klassifiziert wurden (s. Methoden, Anilinblau-Test, S.63).

^e verwendet für ChIP

^f verwendet für mRNA-Extraktion

^g verwendet für Immunhistochemie

^h verwendet für ChIP-on-chip

3.8.2 Ejakulat von infertilen Patienten

Proben von infertilen Patienten wurden im *in-vitro*-Fertilisierungs (IVF)-Zentrum Mittelhessens gesammelt. Auch diese Patienten unterschrieben zuvor eine Einverständniserklärung. Die Patienten kamen in das Zentrum, um eine *Intra-Cytoplasmatic-Sperm-Injection* (ICSI)-Behandlung durchführen zu lassen.

Tab. 5: Übersicht über SpermioGRAMMdaten und Post-Fertilisierungs-Parameter der verwendeten Ejakulatproben von infertilen Patienten.

Proben-Nr.	Ejakulat-Volumen (ml)	Spermien-Dichte (Mio./ml)	Motilität der Spermien (%) (A-B-C-D) ^a	Morphologie der Spermien (%) N ^b	Anilinblau-Färbung 2+&3+ (%) ^c	korrekt fertilisierte Oozyten nach ICSI	Schwangerschaft nach ICSI
1 ^d	5	10	3-5-2-90	7	50	10	Nein
2 ^d	6,5	28	18-30-12-40	20	63	1	Ja
3 ^d	1	6	7-13-30-50	5	50	4	Ja
4 ^d	6,5	34	4-5-5-86	4	57	10	Nein
5 ^d	2	20	3-17-30-50	10	29	4	Nein
6 ^e	2,5	24	6-15-9-70	5	62	10	Ja
7 ^e	5	20	14-16-20-50	10	56	7	Ja
8 ^e	4	11	21-30-9-40	5	57	19	Ja
9 ^e	2,5	10	8-30-12-50	15	82	2	Ja
10 ^e	3,5	24	13-25-12-50	5	86	4	Nein
11 ^e	2,5	16	8-17-25-50	5	88	2	Ja
12 ^f	5	46	20-21-22-37	35	20	5	Nein
13 ^f	4	46	11-11-19-59	10	53	- ^g	- ^g
14	6	96	9-16-6-71	10	25	- ^g	- ^g
15 ^f	2	53	12-59-11-18	20	17	7	Nein
16 ^f	4	98	4-18-12-66	5	31	3	Ja
17 ^f	3	27	12-20-13-55	10	24	5	Ja
18	- ^g	- ^g	12-14-10-64	- ^g	23	3	- ^g
19 ^f	1,5	16	4-5-5-86	5	23	3	Nein
20 ^f	5	112	1-1-2-96	5	28	6	Ja

Material

21 ^f	1	26	2-15-21-64	7	15	3	Nein
22 ^f	2	70	4-40-11-45	12	27	7	Nein
23	2	140	30-22-22-26	30	36	0	- ^g
24 ^f	4	27	13-28-22-37	18	17	10	Ja
25 ^f	5,5	2,1	4-6-6-84	5	14	1	Nein
26 ^f	2,5	61	5-37-13-45	15	11	14	Ja
27 ^f	3	24	7-11-10-72	10	72	4	Ja
28 ^f	4,5	49	13-38-21-28	15	12	1	Nein
29	6	31	13-33-9-45	25	23	13	Ja
30	2	162	7-8-6-79	5	25	5	Nein
31 ^f	2,5	72	17-18-13-52	30	28	10	Ja
32 ^f	5	210	7-13-6-24	5	21	8	Nein
33 ^f	1,5	1,2	10-58-12-20	5	19	3	Ja
34	3	290	20-15-20-45	25	36	2	Nein
35	3	59	34-40-6-20	28	30	9	Nein
36	3	148	11-16-14-59	15	15	13	Ja
37 ^f	4	63	8-10-8-74	15	16	3	Nein
38 ^f	3	115	11-12-8-69	10	27	6	Nein
39 ^f	3	27	9-12-7-72	10	56	6	Nein
40 ^f	4	8	5-3-4-88	10	15	2	Nein
41	4	54	12-12-49-67	10	53	1	Nein
42 ^f	5,5	51	12-11-8-69	5	18	17	Nein
43 ^f	3	12	2-5-4-89	5	59	10	Nein
44 ^f	3,5	25	14-27-25-34	10	60	3	Nein
45 ^f	1,5	77	5-8-5-82	10	70	6	Nein
46 ^f	2	29	9-12-7-72	10	58	2	Nein
47 ^f	9	13	4-6-5-85	5	- ^g	11	Ja
48 ^f	4	19	10-18-8-64	15	39	11	Ja
49 ^f	5	43	4-8-5-83	5	10	2	Nein
50 ^f	3,5	11	9-10-8-73	10	- ^g	6	Nein
51 ^f	2,5	124	11-15-13-61	10	57	12	Ja
52 ^f	5	35	4-33-8-55	22	28	9	Nein
53f	1	59	24-28-14-34	25	61	8	Ja
54 ^f	3	9	6-18-20-56	10	- ^g	9	Ja
55 ^f	4	108	8-14-9-69	10	18	9	Ja
56 ^f	3	58	11-13-9-67	2	51	2	Ja
57 ^f	7	18	14-38-8-40	15	37	3	Nein
58 ^f	2	56	12-12-10-66	15	61	6	Nein
59 ^f	3	7	12-14-10-64	1	19	12	Ja
60	4	108	8-14-9-69	10	18	9	Ja

Material

61 ^f	4	47	13-15-10-62	15	22	7	Nein
62 ^f	4	21	14-10-9-67	15	64	21	Nein
63	2,5	21	12-16-15-57	15	68	0	Nein
64 ^f	4,5	24	7-10-9-74	10	68	7	Nein
65 ^f	2,5	26	8-16-10-66	5	55	6	Nein
66 ^f	3	51	14-15-15-56	20	35	8	Ja
67 ^f	4	34	10-14-20-56	15	68	3	Ja
68 ^f	2	140	30-22-22-26	30	36	0	Nein
69	4	54	12-12-9-67	10	53	1	Nein
70	2,5	21	12-16-15-57	15	68	0	Nein
71 ^h	2,5	4,8	19-20-16-45	8 (Kopfdefekte: 90%)	- ^g	- ^g	- ^g
72 ^h	2,5	34	39-21-12-28	11 (Kopfdefekte: 85%)	- ^g	- ^g	- ^g
73 ^h	3	29,2	3-7-7-83	0 (Kopfdefekte: 92%)	- ^g	- ^g	- ^g

^a nach Kriterien der WHO, s. Methoden (WHO, 1999)

^b N = Normalformen

^c Die Chromatinkondensation gilt als gestört, wenn mind. 25% der Spermatozoen als 2+ oder 3+ klassifiziert wurden (s. Methoden, Anilinblau-Test, S.63).

^d zusammengefasste Gruppe 1 für ChIP und ChIP-on-chip (s. Ergebnis)

^e zusammengefasste Gruppe 2 für ChIP (s. Ergebnis)

^f verwendet für mRNA-Extraktion

^g nicht bestimmt

^h verwendet für Immunhistochemie

3.8.3 Humane Hodenbiopsien

Die Hoden-Proben wurden an der Urologischen Klinik in Gießen zur Klärung einer obstruktiven oder nicht-obstruktiven Azoospermie und zur Durchführung einer testikulären Spermienextraktion (TESE) entnommen (Pantke et al., 2008) und von Prof. Dr. Martin Bergmann, Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, nach einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologisch beurteilt. Restgewebe durfte mit Zustimmung der Ethikkommission für wissenschaftliche Untersuchungen verwendet werden.

Die verwendeten Hodenbiopsien sind von 1996-2007, in Paraffin eingebettet und stammen von 17 Männern. Sieben Proben wurden als qualitativ und quantitativ normale Spermatogenese (Score: 10) und zehn Proben als „bunte Atrophie“ (s. 2.1.6, S.23) oder Hypospermatogenese (Score: 5-7, Bergmann und Kliesch, 1998) klassifiziert (**Tab. 6**).

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten humanen Hodenbiopsien

Proben-Anzahl	Beurteilung	Score	Histologie-Befund
7	Normale Spermatogenese (nsp)	10	unauffällig
1	Hypospermatogenese (hyp)	5	47 Tubulusanschnitte: 17 Tubuli mit elongierten Spermatisden, 18 Tubuli mit runden Spermatisden, 8 Tubuli mit primären Spermatozyten, 4 Tubuli mit Spermatisgonien
1	hyp	5	83 Tubulusanschnitte: 53 Tubuli mit elongierten Spermatisden, 15 Tubuli mit runden Spermatisden, 18 Tubuli mit primären Spermatozyten, 2 Tubuli mit Spermatisgonien, 4 Tubuli mit mehrkernigen Spermatisden
1	hyp, fokales <i>Sertoli-Cell-Only-Syndrom</i> (fsc)	5	45 Tubulusanschnitte: 24 Tubuli mit elongierten Spermatisden, 2 Tubuli mit Spermatisgonien, 17 Tubuli mit <i>Sertoli-Cell-Only-Syndrom</i> (SCO), 2 Tubulusschatten
1	hyp	5	23 Tubulusanschnitte: 11 Tubuli mit elongierten Spermatisden, 4 Tubuli mit runden Spermatisden, 7 Tubuli mit primären Spermatozyten, 1 Tubulus mit Spermatisgonien; mehrkernige Spermatisden, 1 Tubulusdivertikel
1	hyp	6	78 Tubulusanschnitte: 45 Tubuli mit elongierten Spermatisden, 22 Tubuli mit runden Spermatisden, 11 Tubuli mit primären Spermatozyten
1	hyp	6	68 Tubulusanschnitte: 39 Tubuli mit elongierten Spermatisden, 3 Tubuli mit runden Spermatisden, 25 Tubuli mit primären Spermatozyten, 1 Tubulus mit Spermatisgonien, 3 Tubuli mit mehrkernigen Spermatisden

1	hyp	5 oben 7 Mitte 1 unten (3 Proben wurden entnommen)	Oben: 61 Tubulusanschnitte: 32 Tubuli mit elongierten Spermatozyten, 11 Tubuli mit runden Spermatozyten, 28 Tubuli mit primären Spermatozyten Mitte: 68 Tubulusanschnitte: 47 Tubuli mit elongierten Spermatozyten, 7 Tubuli mit runden Spermatozyten, 14 Tubuli mit primären Spermatozyten Unten: 113 Tubulusanschnitte: 13 Tubuli mit elongierten Spermatozyten, 8 Tubuli mit runden Spermatozyten, 81 Tubuli mit primären Spermatozyten, 11 Tubuli mit Spermatozyten
1	hyp	7	40 Tubulusanschnitte: 28 Tubuli mit elongierten Spermatozyten, 1 Tubulus mit runden Spermatozyten, 10 Tubulusschatten
1	hyp	6	79 Tubulusanschnitte: 50 Tubuli mit elongierten Spermatozyten, 2 Tubuli mit runden Spermatozyten, 27 Tubuli mit primären Spermatozyten
1	hyp	5	152 Tubulusanschnitte: 75 Tubuli mit elongierten Spermatozyten, 17 Tubuli mit runden Spermatozyten, 28 Tubuli mit primären Spermatozyten, 2 Tubuli mit Spermatozyten

3.8.4 Referenzmaterial

Blut:

Eine Blutprobe wurde freundlicherweise von einem Mitglied der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Steger zur Verfügung gestellt und von einem Arzt der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie entnommen.

Humane Hoden mRNA:

Hoden mRNA wurde als Kontrolle gekauft (Nr. 636533, Clontech, Mountain View, CA, U.S.A) und wie in den Methoden beschrieben in cDNA umgeschrieben.

HeLa-Zellen:

HeLa-Zellen sind Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs), welche ursprünglich von der afroamerikanischen Frau **Henrietta Lacks** stammen. Sie wurden 1951 bei einer Operation in Baltimore entnommen und als erste menschliche Zelllinie etabliert (Gey et al., 1952; Nagl, 1980). Die Zellen enthalten eine Mutation in der HLA (Humanes Leukozyten-Antigen)-Supergenfamilie.

Zudem waren die Zellen vom Papillomvirus 18 (HPV18) befallen, wodurch ein virales Protein in die Zellen gelangte, welches den p53 Tumorsuppressor inaktiviert.

Die verwendeten HeLa-Zellen wurden freundlicherweise vom Institut für Genetik, Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt. Sie wurden in einem Medium mit 10% fetalem Kalbsserum, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) bei 37°C und 5% CO₂ in der Luft kultiviert, wie in Burke et al. (2005) beschrieben.

Prostata-Gewebe:

Prostata-Gewebeproben, die um Tumore lokalisiert waren, wurden von Patienten entnommen, die entweder radikale Prostatektomie oder Zystoprostatektomie in der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, durchführen ließen. Die Proben wurden als sogenannte *Benign Prostate Hyperplasia* (BPH) klassifiziert und konnten für die Forschung verwendet werden, nachdem die Patienten eine Einverständniserklärung unterschrieben hatten.

3.9 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser; Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig

Einmalküvetten; Eppendorf, Hamburg

Filter MillexTM; Millipore, Bedford, MA, U.S.A

Filterpapier Whatman 3MM; Whatmann GmbH, Dassel

Indikator-Papier 5,4-10,0 und 6,4-8,0; Merck, Darmstadt

Nadeln, verschiedene Größen; Braun, Melsungen

Kryo-Objekträger; R. Langenbrink, Emmendingen

Objekträger; Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig

Spitzen, verschiedene Größen; Nerbe-Plus, Winsen (Luhe)

Spritzen, verschiedene Größen; Terumo, Leuven, Belgien

Tubes, verschiedene Größen; Sarstedt, Nümbrecht

3.10 Andere Materialien

Agilent Chip Priming Station; Agilent Technologies, Waldbronn

Bechergläser, Messzylinder; Schott Duran, Mainz

Hamilton-Spritze; Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Neubauer Zählkammer; Lo Laboroptik, Friedrichsdorf

Nitrocellulose-Membran und Filterpapiere; Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A

NuPage[®] Gele (10%); Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A

RNA 600 Nano chip; Agilent technologies, Waldbronn

Pipetten; Nerbe Plus, Winsen (Luhe)

3.11 Computerprogramme und Internetseiten

UCSC Genome Bioinformatics: DNA-Sequenzen, Gen-Informationen, ENCODE-Informationen: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgNear>; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>; <http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>

Primer 3: Primer-Design: <http://frodo.wi.mit.edu/>

Oligonucleotide Properties Calculator: Primer-Überprüfung:

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

NCBI Primer BLAST: Primer-Überprüfung

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd

Normfinder, GeNorm, GenEx pro 4.3.7 software (Multid Analyses AB Copyright©, limited version)

SignalMap Software, Version 1,9; NimbleGen Service, imaGenes

4. Methoden

4.1 Das Spermogramm

Die Samenanalyse (Köhn et al., 2002) stellt eine Grundlage der andrologischen Untersuchungen dar. Sie erlaubt jedoch nur teilweise Rückschlüsse auf die Ursache einer Fertilitätsstörung. So kann z. B. eine geringe Spermienanzahl (Oligozoospermie, s. u.) mehrere Ursachen wie Hodenhochstand, partielle retrograde Ejakulation, Medikamente oder Stress haben.

Nach Anzahl, Motilität und Morphologie können Ejakulatbefunde wie folgt eingeteilt werden:

Tab. 7: Einteilung von Ejakulatbefunden nach WHO-Kriterien (WHO, 1999)

Normospermie	Normale Ejakulatbefunde
Oligozoospermie	< 20 Mio. Spermatozoen/ml
Astenozoospermie	< 50% Spermatozoen mit progressiver Motilität (WHO a+b) oder < 25% Spermatozoen mit linear progressiver Motilität (WHO a)
Teratozoospermie	< 15% Spermatozoen mit normaler Morphologie
Oligoasthenoteratozoospermie (OAT)	Kombination der drei zuvor genannten Defekte
Azoospermie	Keine Spermatozoen im Ejakulat
Aspermie	Kein Ejakulat

Als normal wurden von der WHO (WHO, 1999) folgende Werte für Ejakulat festgelegt:

Tab. 8: Normalwerte für Ejakulat nach WHO (WHO, 1999)

Verflüssigungszeit:	< 60 Minuten
Volumen:	≥ 2ml
pH:	≥ 7,2
Spermatozoenkonzentration:	≥ 20x 10 ⁶ /ml
Gesamt-Spermatozoenzahl:	≥ 40x 10 ⁶
Motilität:	≥ 50% Beweglichkeit der Kategorien a+b, oder ≥ 25% Beweglichkeit der Kategorie a
Morphologie:	≥ 15% Spermatozoen mit normaler Morphologie
Vitalität:	≥ 50% lebende Spermatozoen
Leukozyten:	< 1x 10 ⁶ /ml

Es ist zu beachten, dass selbst bei gesunden Männern erhebliche Schwankungen der Ejakulatqualität vorkommen. Deswegen empfiehlt es sich mindestens zwei Ejakulate in einem Abstand zwischen sieben Tagen und drei Monaten zu untersuchen.

Des Weiteren nimmt die sexuelle Karenz einen entscheidenden Einfluss auf die Ejakulatqualität. Bei der Gewinnung des Ejakulats sollte eine Karenzzeit von zwei bis sieben Tagen eingehalten werden. Wird die Karenzzeit unterschritten, kann dies zu einem geringeren Volumen und zu einer geringeren Spermatozoenkonzentration führen. Bei einer Überschreitung kann die Motilität oder Morphologie der Spermatozoen beeinflusst werden. Normales Ejakulat sollte homogen erscheinen und eine graue bis gelbliche Farbe besitzen. Ejakulat, das wässrig-durchscheinend aussieht, deutet auf eine geringe Spermatozoenkonzentration hin. Bei bräunlicher Färbung enthält das Ejakulat Blutzellen.

Direkt nach der Ejakulation hat das Ejakulat eine zähflüssige Konsistenz. Innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur setzt jedoch normalerweise die Verflüssigung ein. Zur Untersuchung der Konsistenz saugt man das Ejakulat nach einer Stunde mit einer Pipette auf und versucht es anschließend abtropfen zu lassen. Tropft das Ejakulat ab, liegt eine normale Viskosität vor, zieht das Ejakulat Fäden, liegt Viskosipathie vor.

Zur Bestimmung des Volumens muss das Ejakulat vollständig verflüssigt sein. Wenn sich das Ejakulat im vorherigen Test als viskos erweist, muss 5mg α -Chymotrypsin hinzugegeben und 15-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Das Volumen wird in einem skalierten Zentrifugenröhrchen bestimmt.

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgt noch innerhalb der ersten Stunde nach der Ejakulation mit Hilfe von Indikator-Papier. Das Papier wird in das Ejakulat getaucht und nach 30 Sekunden abgelesen.

Das Ejakulat darf zur Bestimmung der Motilität nicht auskühlen. 10 μ l Ejakulat werden auf einen Objektträger mit Deckglas gegeben. Unter dem Lichtmikroskop werden 100 aufeinanderfolgende frei bewegliche Spermatozoen bezüglich ihrer Beweglichkeit beurteilt (Kategorie **a** bis **d**, s. u.).

a	Schnelle Vorwärtsbewegung (linear-progressive Motilität)
b	Langsame Vorwärtsbewegung (träge Motilität)
c	Keine progressive Beweglichkeit (nur lokale Motilität)
d	Keine Beweglichkeit (Immotilität)

Die Vitalität wird wie folgt untersucht: 10 μ l Ejakulat und 10 μ l Eosin-Gebrauchslösung werden auf einen Objektträger pipettiert, 30-60 Sekunden stehen gelassen und danach vermischt. Anschließend wird ein Deckglas aufgelegt und unter dem Mikroskop betrachtet. Es werden 100 Spermien ausgezählt, die entweder gefärbt (tot) oder ungefärbt (lebend) sind.

Methoden

Zur Bestimmung der Spermatozoenkonzentration wird das Ejakulat nach folgendem Schema verdünnt:

< 20x 10 ⁶ Spermatozoen/ml	Verdünnung 1:10 = 100µl Ejakulat + 900µl Immobilisierungslösung
< 20x 10 ⁶ - 100x 10 ⁶ Spermatozoen/ml	Verdünnung 1:20 = 50µl Ejakulat + 950µl Immobilisierungslösung
> 100x 10 ⁶ Spermatozoen/ml	Verdünnung 1:50 = 20µl Ejakulat + 980µl Immobilisierungslösung

Dann werden beide Kammern der Neubauer-Zählkammer mit 10µl des Gemischs gefüllt. Zur Sedimentation der Zellen wird die Kammer fünf Minuten in eine feuchte Kammer (z. B. Petrischale mit Deckel, ausgelegt mit einem feuchten Papiertuch) gestellt. Unter dem Mikroskop zählt man dann die Spermatozoen im zentralen Raster der Zählkammer. Das zentrale Raster besteht aus 16 Großquadraten. Jedes Großquadrat besteht zusätzlich aus 16 Kleinstquadraten. Spermien auf den linken und oberen Begrenzungslinien werden mitgezählt. Jedoch werden Spermien ohne Flagellum und „Stecknadelköpfe“ nicht berücksichtigt. Die Berechnung der Spermatozoenkonzentration findet nach folgendem Schema statt:

Fläche der 16 Großquadrate: 1mm²

Höhe der Kammer: 0,1mm

Volumen der 16 Großquadrate: 0,1µl

n = Spermatozoen in 0,1µl 1:20 (1:10 oder 1:50) verdünntem Ejakulat

$n \times (1,0:0,1) \times 20$ (10 oder 50) = Spermatozoen in 1µl unverdünntem Ejakulat

$n \times (1,0:0,1) \times 20$ (10 oder 50) $\times 1000$ = Spermatozoen in 1ml unverdünntem Ejakulat

Bei Verdacht auf Azoospermie wird keine Verdünnung vorgenommen, sondern das Ejakulat bei 1.000rpm zehn bis 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Der Anteil normal geformter und beweglicher Spermien entspricht dem Anteil der normalen Spermatogenese im Hoden. Bei jedem Patienten findet sich zusätzlich ein individuelles Muster an Spermatozoen, die von der Normalform abweichen. Ein normal geformtes Spermatozoon hat folgende Maße:

Kopfsegment:

Länge: 3-5 μ m

Breite: 2-3 μ m

Akrosomale Region: 40-70% der Kopffläche

Zytoplasma: >1/3 der Kopffläche

Mittelstück:

Länge: 5-7 μ m

Breite: ~1 μ m

Flagellum: ~ 45 μ m

Zur Beurteilung der Spermatozoenmorphologie werden Ausstrich-Präparate angefertigt und die Spermatozoen eingefärbt. Für einen Ausstrich pipettiert man 10 μ l Ejakulat auf einen Objektträger. Mit einem zweiten Objektträger verteilt man dann das Ejakulat über den gesamten Objektträger. Dazu setzt man den zweiten Objektträger in einem spitzen Winkel an und verfährt wie bei einem Blutausstrich. Die fertigen Ausstriche müssen über Nacht trocknen. Anschließend werden die Ausstriche mit der Schorr-Färbemethode behandelt. Alternative Färbemethoden könnten mit Papanicolaou, Giemsa, Hemacolor® oder Spermac® durchgeführt werden.

Zuerst werden die Ausstriche zehn Minuten in 100%igem Ethanol fixiert. Dann werden sie eine Minute mit 70%igem Ethanol gewaschen. Danach werden sie fünf bis zehn Minuten in Hämalaun (nach Mayer) inkubiert. Anschließend werden sie drei Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Dann werden die Ausstriche jeweils zehn Sekunden in 70%igem und 95%igem Ethanol fixiert. Anschließend erfolgt die Färbung in Schorr'scher Farblösung.

Danach wird zweimal für zehn Sekunden in 95%igem Ethanol gewaschen und danach dreimal kurz in 100%igem Ethanol. Zum Schluss wird zweimal in Xylol für fünf Minuten gewaschen.

Unter dem Mikroskop kann man anschließend die Spermatozoenmorphologie betrachten. Neben normalen Spermatozoen, einschließlich Grenzformen, kann man folgende Störungen finden (WHO, 1999) (Vgl. auch **Abb. 11**):

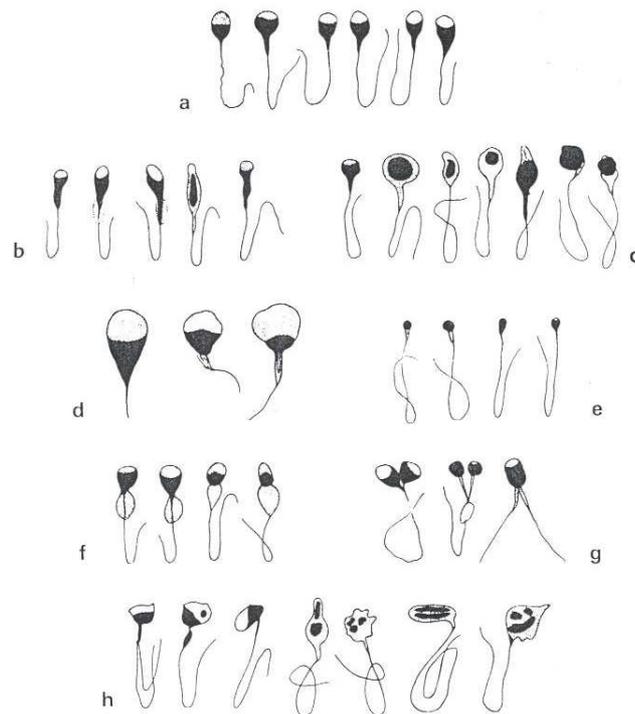


Abb. 11: Normal geformte (a) und fehlgeformte Spermien (b-h). b: birnenförmige Spermien, c: runde Spermien, d: vergrößerte Spermien, e: verkleinerte Spermien, f: Spermien mit Protoplasmatropfen, g: doppelförmige Spermien, h: amorphe Spermien (Haidl und Krause, 1998).

Abnorme Form und/oder Größe des Spermatozoonkopfes:

- große Köpfe
- kleine Köpfe
- Vakuolen (> 20% der Kopffläche)
- Überstreckungen (zigarrenförmig, birnenförmig)
- Amorphe Köpfe
- Doppelköpfe

Defekte des Hals- und Mittelstücks:

- Fehlen des Schwanzes
- Irregulärer Ansatz des Flagellums mit Abknickungen
- Formstörungen des Mittelstücks
(unregelmäßig geformt, geknickt, erweitert, dünn)

Schwanzdefekte:

- Flagellum zu kurz
- Kaliberschwankungen

- Abknicken des Flagellums
- Aufrollungen des Flagellums
- Doppel-/Mehrfachschwänze

Zytoplasmotropfen (> 1/3 des Spermatozoonkopfes)

Zur Beurteilung der Morphologie werden folgende Punkte berücksichtigt: Es werden 100-200 Spermatozoen ausgezählt. Jeder Defekt wird ausgewertet. Stecknadelköpfe zählen nicht zu den Kopfdefekten. Ein gehäuftes Auftreten wird aber vermerkt. Vorläuferzellen der Spermatogenese werden nicht als Spermatozoen gewertet.

4.2 Anilinblau-Test (Status der Chromatinkondensation)

500µl Ejakulat und 3ml HFT-HSA-Puffer werden zehn Minuten bei 300-1.200rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wird auf einen Objektträger ausgestrichen und an der Luft bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Danach wird der Objektträger 30 Minuten in Glutaraldehyd-Lösung fixiert und anschließend kurz in Aqua bidest. gewaschen. Dann wird fünf Minuten in Anilinblau-Lösung gefärbt und nochmals in Aqua bidest. gewaschen. 100 Spermatozoen werden analysiert und die Chromatinkondensation nach den Vorgaben von Henkel et al. (1994) klassifiziert:

0 = keine Anfärbung des Spermatozoonkopfes

1+ = nur schwache Anfärbung, der akrosomale Ring ist sichtbar, weniger als die Hälfte des Spermatozoonkopfes ist angefärbt

2+ = mittelstarke bis starke Färbung über den akrosomalen Ring hinaus

3+ = tiefblaue Färbung des gesamten Spermatozoons

Die Chromatinkondensation gilt als gestört, wenn 25% oder mehr der Spermatozoen eine Färbung des Grades 2+ und 3+ aufweisen.

4.3 Spermienwaschung

Um sicher zu gehen, dass man nur DNA, RNA oder Proteine aus Spermien isoliert, muss man die Spermien aus dem Ejakulat filtern. Dazu wird das Ejakulat gewaschen, um unter anderem Zellreste, Leukozyten, Prostaglandine und tote Spermien zu entfernen.

Zusätzlich wird dabei das Ejakulat auf ein geringeres Volumen reduziert. Es gibt drei Hauptmethoden der Spermienwaschung: die Swim-up-Methode, die Dichte-Gradient-Methode und die einfache Waschung. Die Swim-up-Methode ist bei Patienten mit normalen Ejakulatparametern die Gebräuchlichste.

4.3.1 Swim-up

Für den Swim-up wird 1ml natives Ejakulat verwendet, welches 1:5 mit HFT-Medium und 2%igem HSA verdünnt wird. Anschließend wird zehn Minuten bei 1.500rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 1ml HFT-Medium mit 2%igem HSA überschichtet. Das Pellet darf nicht resuspendiert werden. Dann erfolgt eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Danach können die Dichte und die Motilität der Spermien bestimmt werden.

4.4 Immunhistochemie (IHC, Lichtmikroskopischer Protein-Nachweis)

Immunhistochemie dient dazu, ein bestimmtes Protein mittels eines spezifischen Antikörpers in Geweben oder Extrakten nachzuweisen. Der Antikörper bindet sich an ein Antigen im Gewebe/Extrakt und dieser Komplex kann auf verschiedene Weisen visualisiert werden. Zum Beispiel durch ein Enzym, wie Peroxidase, welches eine Reaktion mit Farbumschlag katalysiert. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass der Antikörper an ein Fluorophor gebunden ist, z. B. FITC.

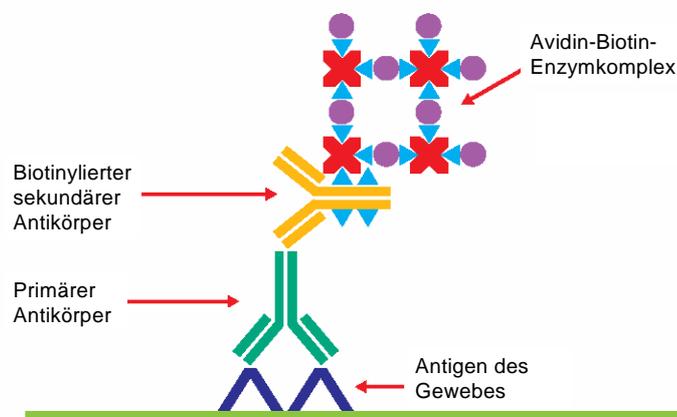


Abb. 12: Die ABC-Methode: Der Avidin-Biotin-Enzymkomplex reagiert mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (verändert nach Boenisch, 2006; Dako).

Des Weiteren werden Avidin-Biotin-Komplexe (ABC) genutzt (Hsu et al., 1981; **Abb. 12**), die auf der starken Affinität des Avidins bzw. Streptavidins zu Biotin beruhen.

Das Biotin ist an einen sekundären Antikörper gekoppelt, der wiederum an den primären Antikörper im Gewebe/Extrakt bindet. Zudem ist Biotin in einen Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex integriert (Heras et al., 1995).

4.4.1 Immunhistochemie an Ejakulat

4.4.1.1 Vorbehandlung der Spermien: Akrosomreaktion und Ultraschall

500µl Ejakulat wird mit 3ml *Sperm Preparation Medium* versetzt und zehn Minuten bei 1.500rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 500µl *Sperm Preparation Medium* resuspendiert. Dann wird das Gemisch bei 4°C über Nacht zur Induktion der Akrosomreaktion inkubiert. Am nächsten Tag wird die Probe drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Probe für acht Minuten Ultraschall ausgesetzt. Dann wird die Probe fünf Minuten bei 1.500rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 500µl PBS resuspendiert. Anschließend wird je 10µl des Gemisches auf Objektträgern ausgestrichen. Die Ausstriche sollten mindestens über Nacht trocknen, bevor eine Immunhistochemie durchgeführt wird.

4.4.1.2 Immunhistochemische Reaktion

Die Inkubationen erfolgen in feuchten Kammern (lichtundurchlässig, mit feuchtem Filterpapier ausgelegt).

Die Objektträger mit den Ausstrichen werden für 15 Minuten in *Decondensing Mix* (van der Heijden et al., 2006) inkubiert. Dann werden die Proben in 4%igem Paraformaldehyd für 20 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Proben kurz in 1x Tris-HCl-Puffer gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 1-10%igem SDS versetzt (Die Probe wird dazu mit *PAP-Pen* eingekreist, damit die nachfolgenden Puffer/Lösungen nicht vom Objektträger fließen.). Die SDS-Inkubation wird mit kaltem 1x Tris-HCl-Puffer abgestoppt (2x fünf Minuten). Dann wird 30 Minuten in 3%igem H₂O₂ in Methanol inkubiert. Danach wird nochmals in 1x Tris-HCl-Puffer gewaschen (2x fünf Minuten). Anschließend wird 45 Minuten in 3%igem BSA-Blockpuffer inkubiert.

Dann wird der Primärantikörper in 5%igem BSA-Blockpuffer verdünnt und die Proben über Nacht mit der Antikörper-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wird zweimal in 1x Tris-HCl-Puffer für fünf Minuten gewaschen und anschließend für 45 Minuten mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper wird in 1x Tris-HCl-Puffer verdünnt. Dann wird nochmals zweimal in 1x Tris-HCl-Puffer gewaschen. Danach wird für 60 Minuten mit ABC-Lösung inkubiert. Die ABC-Lösung wird mindestens eine halbe Stunde vor Gebrauch angesetzt. Anschließend wird zweimal in 1x Tris-HCl-Puffer gewaschen. Danach wird mit DAB-Lösung mindestens 20 Minuten entwickelt. Die DAB-Lösung darf nicht länger als zehn Minuten vorher angesetzt werden (nach Herstellerangaben: 1 Tropfen DAB auf 300µl DAB-Puffer) und zum Auftragen muss eine Spritze mit Filter verwendet werden. Die Entwicklung erfolgt im Dunkeln. Die DAB-Färbung wird in Aqua bidest. abgestoppt. Kaisers Glyceringelatine wird bei 40°C im Wasserbad erwärmt und zum Eindecken verwendet (Hecht et al., 2009).

4.4.2 Immunhistochemie an Hodenbiopsien

4.4.2.1 Fixierung in Bouin

Die Hodenbiopsie-Proben werden 24 Stunden in Bouin'scher Lösung fixiert. Nach der Fixierung werden die Proben sieben Tage lang in 70%igem Ethanol gewaschen, bis die gelbe Farbe heraus gewaschen ist. Anschließend erfolgt die Dehydrierung und Einbettung in Paraffin.

4.4.2.2 Dehydrierung und Einbettung in Paraffin

Die Hodenbiopsie-Proben werden nach folgendem Schema zunächst dehydriert und danach eingebettet. Dabei wird das entzogene Wasser durch Paraffin oder Paraplast ersetzt: 2x 1-2h in 70%igem Ethanol, 2x 1-2h in 80%igem Ethanol, 2x 1-2h in 96%igem Ethanol, 2x 1-2h in 100%igem Ethanol (nicht länger als 12h), 1-4h in Methylbenzoat, 24h oder länger in Methylbenzoat, 24h oder länger in Methylbenzoat, mindestens 1-4h bei 58-60°C in Paraplast, mindestens 2-12h bei 58-60°C in Paraplast und mindestens 4-24h bei 58-60°C in Paraplast.

4.4.2.3 Herstellung von Schnitten

Von den paraffinierten Hodenbiopsie-Proben werden 5µm dicke Schnitte am Mikrotom hergestellt, auf eine Wasseroberfläche (z. B. eine Schlüssel mit Aqua bidest.) zum Glätten gelegt und auf Kryo-Objektträger aufgezogen. Dabei wird der Objektträger leicht schräg ins Wasser gehalten und auf die Schnitte zu bewegt, bis diese mit einer Kante am Objektträger haften bleiben. Anschließend werden die Proben im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

4.4.2.4 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H+E-Färbung)

Eine Hämatoxylin- und Eosin-Färbung erleichtert die Auswertung immunhistologischer Färbungen, da Hämatoxylin die Zellkerne blau und Eosin das Zytoplasma pink färbt (Vgl. Abb. 4, S. 22). Es empfiehlt sich daher, zu jedem Schnitt, der immunhistochemisch behandelt wird, einen weiteren Schnitt mit einer H+E-Färbung anzufertigen.

Dazu sollten Serienschnitte verwendet werden, damit noch derselbe Ausschnitt (dieselben Tubuli) zu sehen ist. Eine H+E-Färbung wird nach folgendem Schema durchgeführt:

3x 10 Minuten in Xylol, 2x 5 Minuten in 100%igem Ethanol, 1x 5 Minuten in 96%igem Ethanol, 1x 5 Minuten in 80%igem Ethanol, 1x 5 Minuten in 70%igem Ethanol, 1x 5 Minuten in 50%igem Ethanol, 1x 5 Minuten in Aqua bidest., 7 Minuten in Hämatoxylin, 15 Minuten unter fließendem Aqua bidest., 7 Minuten in 1%igem Eosin, 1x kurz in Aqua bidest. waschen, 1x kurz in 70%igem Ethanol waschen, 1x kurz in 80%igem Ethanol waschen, 2 Minuten in 80%igem Ethanol waschen, 2 Minuten in 96%igem Ethanol waschen, 3 x 2 Minuten in 100%igem Ethanol waschen, 3x 10 Minuten in Xylol waschen. Anschließend werden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt. Die Gelatine muss dazu im 40°C Wasserbad erwärmt werden.

4.4.2.5 Immunhistochemische Reaktion

Die Inkubationen erfolgen in feuchten Kammern.

Zunächst werden die Hodenbiopsie-Schnitte über Nacht bei 60°C in Xylol gestellt. Am nächsten Tag wird die folgende Alkoholreihe durchgeführt: je fünf Minuten in Xylol, 100%igem Ethanol, 96%igem Ethanol, 70%igem Ethanol und Aqua bidest..

Anschließend wird einmal fünf Minuten in 1x Tris-HCl-Puffer gewaschen. Danach wird 20 Minuten in Citratpuffer gekocht (98°C). Dann erfolgt eine Waschung für fünf Minuten in 1x Tris-HCl-Puffer. Anschließend erfolgt eine 30minütige Inkubation in 3%igem H₂O₂ in Methanol. Ab diesem Schritt werden alle folgenden Schritte wie bei der Immunhistochemie an Ejakulat-Ausstrichen durchgeführt (s. 4.4.1.2, S. 65) (Hecht et al., 2009).

4.5 Bestimmung von Protein-/Nukleinsäurekonzentrationen am Spektralphotometer

Bei schnellen Konzentrationsbestimmungen von Proteinen und Nukleinsäuren werden Absorptionsmessungen genutzt. Es gilt, dass die Intensität eines Lichtstrahls einer Wellenlänge beim Durchlaufen einer transparenten Substanz durch die Absorption der elektromagnetischen Strahlung abnimmt. Dies wird durch das Lambert-Beersche-Gesetz dargestellt: $E = \epsilon cd$.

E = Extinktion

ϵ = Molarer Absorptionskoeffizient (cm² x mol⁻¹)

d = Länge der Messstrecke (Küvette) (cm)

c = Konzentration der absorbierenden Moleküle (mol⁻¹)

Des Weiteren nimmt die Intensität des einstrahlenden Lichtes exponentiell längs des Weges ab: $\text{Log } I_0/I = E = \epsilon cd$.

I₀ = Intensität des eingestrahnten Lichtes

I = Intensität des gemessenen Lichtes

Anstelle der Absorption kann auch die Transmission T% angegeben werden.

Es gilt: $T\% = 100 \times I / I_0$.

In der Realität kann man mit üblichen Spektralphotometern im Bereich von E = 0,05-1,5 messen. Für Messungen im sichtbaren Bereich können Küvetten aus Glas oder Kunststoff verwendet werden. Für Messungen im UV-Bereich (200-400nm) müssen Küvetten aus Quarz verwendet werden (Freifelder, 1982; Segel 1976). Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt bei 260nm und von Proteinen auf Grund der Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei 280nm. Für Proteinbestimmungen in Zellextrakten ergibt sich folgende empirische Formel: $1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}$. Zusätzlich kann man mit Hilfe der Absorption die Reinheit einer Nukleinsäurepräparation abschätzen.

Der Quotient E_{260}/E_{280} sollte dabei zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Lottspeich und Zorbas 1998).

4.5.1 Photometrische Protein-Messung mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Die BCA-Methode ist ein empfindlicher Proteinnachweis im Bereich von 0,2-50 μ g. Bei einer Messwellenlänge von 562nm wird gegen einen Kalibrationsstandard z. B. BSA gemessen. Für die Messung sind die Peptidbindungen der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin von Bedeutung. Bei dieser Methode werden unter alkalischen Bedingungen Cu(II)-Ionen zu Cu(I)-Ionen durch die oben genannten Aminosäuren reduziert. Ein Cu(I)-Ion wird durch zwei Moleküle BCA zu einem roten Farbkomplex gebunden (Smith et al., 1985).

Zur Durchführung wird zunächst eine Lösung (A+B) angesetzt: 100 μ l Stammlösung A und 2 μ l Stammlösung B. Anschließend werden ein Standard und die verschiedenen Verdünnungen nach folgendem Schema pipettiert:

95 μ l (A+B) + 5 μ l Standard
95 μ l (A+B) + 5 μ l Probe
95 μ l (A+B) + 2,5 μ l Probe + 2,5 μ l 1%iges SDS (gegebenenfalls weitere Verdünnungen)
95 μ l (A+B) + 5 μ l 1%iges SDS (Leerwert, „Blank“)

Alle Proben werden mit dem Vortexer gemischt und zentrifugiert. Anschließend werden sie 30 Minuten bei 37°C inkubiert und müssen innerhalb von zehn Minuten gemessen werden. Als erstes erfolgt der Leerwert, dann die Proben. Die Proteinkonzentration sollte 2 μ g/ μ l betragen, um für einen Western Blot verwendet werden zu können.

4.5.2 Photometrische Protein-Messung nach Bradford

Bei der Bradford-Methode (Bradford, 1976) liegt der Messbereich zwischen 1-20 μ g Protein. Die Messwellenlänge beträgt 590nm. Bei der Messung wird Coomassie Brilliant Blue verwendet. Dessen Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 zu 590nm in Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu. Die Bradford-Methode ist empfindlicher als BCA oder Lowry, aber funktioniert nicht mit Substanzen, die das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue beeinflussen.

Zur Durchführung wird Bradfordreagenz und eine Stocklösung BSA mit einer Konzentration von 1mg/mL verwendet (10x BSA).

Die Stocklösung wird auf 100µg/ml verdünnt (1x BSA). Mit der 1x BSA-Lösung wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, anhand derer später die Standardkurve gemessen wird.

Die Verdünnungsreihe sollte in dem Puffer der zu messenden Probe angefertigt werden.

Die zu messende Probe wird ebenfalls in dem Puffer der Probe oder Aqua bidest. verdünnt in den Konzentrationen 1:10, 1:100 und 1:1000.

Standard BSA 1	0µl 1x BSA + 200µl Bradfordreagenz + 800µl Puffer/Aqua bidest.
Standard BSA 2	10µl 1x BSA + 200µl Bradfordreagenz + 790µl Puffer/Aqua bidest.
Standard BSA 3	20µl 1x BSA + 200µl Bradfordreagenz + 780µl Puffer/Aqua bidest.
Standard BSA 4	35µl 1x BSA + 200µl Bradfordreagenz + 765µl Puffer/Aqua bidest.
Standard BSA 5	50µl 1x BSA + 200µl Bradfordreagenz + 750µl Puffer/Aqua bidest.
Leerwert („Blank“)	200µl Bradfordreagenz + 800µl Puffer/Aqua bidest
Probe	10µl Probe + 200µl Bradfordreagenz + 790µl Puffer/Aqua bidest
Probe 1: 10	1µl Probe + 200µl Bradfordreagenz + 799µl Puffer/Aqua bidest
Probe 1: 100	0,1µl Probe + 200µl Bradfordreagenz + 799,9µl Puffer/Aqua bidest
Probe 1:1000	0,01µl Probe + 200µl Bradfordreagenz + 799,99µl Puffer/Aqua bidest

Vor der Messung müssen die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Als erstes werden die Proben der Standardkurve gemessen. Kann eine Standardkurve hergestellt werden, erfolgt danach die Messung der Probe.

4.6 Messung von Nukleinsäuren am NanoDrop® ND-1000-Gerät

Am NanoDrop® ND-1000-Gerät können RNA- und DNA-Proben von 2ng/µl-3,7µg/µl unverdünnt gemessen werden. Dazu wird nach einem Leerwert mit 1µl Aqua bidest. jeweils 1µl Probe aufgetragen. Zusätzlich zu dem Messwert erhält man eine Absorptionskurve im Wellenlängenbereich zwischen 220 und 350nm und kann anhand dieser und den Verhältnissen E_{260}/E_{280} (optimal: 1,8-2,0; eventuell Proteinverunreinigung) und E_{260}/E_{230} (optimal: 2,0-2,2; eventuell Pufferverunreinigungen wie Ethanol, Phenol usw.) den Reinheitsgehalt der Nukleinsäuren abschätzen.

4.7 Histon-Extraktion (Kernprotein-Extrakt) für Western Blot

Für einen Proteinnachweis mittels Western Blot, werden Histone aus den Zellkernen von Spermien isoliert. Die Ablösung von der DNA erfolgt durch schwefelige Säure.

Zu Beginn wird 200-500µl Ejakulat (ca. 20-50 Mio. Spermien) benötigt. Zu dem Ejakulat wird 1ml eiskalter Lysispuffer gegeben und das Gemisch mit dem Ultra-Turrax-Gerät homogenisiert.

Danach wird das Gemisch dreimal für zehn Minuten bei 18.000rpm und 4°C zentrifugiert, um die Zellkerne zu gewinnen. Der Überstand wird jeweils verworfen und zum Waschen 1ml Lysispuffer hinzugegeben.

Anschließend wird das Pellet in 100µl Tris-EDTA-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Dann wird 1,1µl H₂SO₄ dazugegeben und mit dem Vortexer gemischt, um die Histone aus den Zellkernen zu entfernen. Das Gemisch wird bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird zehn Minuten bei 18.000rpm zentrifugiert und der Überstand mit den Histonen in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dann wird 1ml Aceton hinzugegeben und mindestens über eine Nacht bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert. Am nächsten Tag wird zehn Minuten bei 18.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wird 1ml Aceton dazugegeben und nochmals zentrifugiert. Anschließend wird das Histon-Pellet bei 37°C getrocknet, welches als weißer „Puder“ sichtbar wird. Danach werden die Histone in 15-50µl 1%igem SDS (in Aqua bidest.) resuspendiert und zehn Minuten bei 70°C inkubiert, wobei alle zehn Minuten mit dem Vortexer gemischt wird. Dann wird noch einmal bei 18.000rpm zentrifugiert. Das Pellet kann nach diesem Schritt bei -20°C aufbewahrt werden und für eine weitere Histon-Extraktion verwendet werden (Dabei wird es in 20-50µl 1%igem SDS resuspendiert und 30-60 Minuten bei 70°C inkubiert.). Der Überstand wird zur Proteinmessung (BCA-Methode) und für den Western Blot verwendet.

4.8 Western Blot (Nachweis von Proteinen)

Beim Western Blot werden Proteine aus einem Extrakt auf eine Membran überführt und anschließend einer spezifischen Nachweisreaktion unterzogen. Es werden dazu folgende Arbeitsschritte durchgeführt: Die Proben des Protein-Extraktes werden zunächst denaturiert, danach folgen eine Gel-Elektrophorese und ein Elektro-Transfer (Blot). Nach dem Blotten kann man die gesamten Proteine auf dem Gel z. B. mit Coomassie Brilliant Blue einfärben, um einen Eindruck von der Effizienz des Blottens zu erhalten.

Anschließend erfolgen die Nachweisreaktion auf der Membran mittels eines spezifischen Antikörpers und die Visualisierung der Reaktion. Man kann mit dem Western Blot-Verfahren das Vorhandensein eines Proteins und das Mengenverhältnis von Proteinen in verschiedenen Proben nachweisen (Towbin et al., 1979, Burnette, 1981). Zusätzlich ist das Western Blot-Verfahren ein Indiz für die Spezifität eines Antikörpers.

4.8.1 Gel-Elektrophorese

Vor dem Auftragen müssen die Proben zum Denaturieren 10 min. bei 70°C mit Proben-Puffer (auch bekannt als Laemmli Puffer; Laemmli, 1970) und *Reducing Agent* inkubiert werden: 10,1 µl Probe; 3,5 µl Proben-Puffer und 1,4µl *Reducing Agent*.

Der Proben-Puffer enthält SDS, welches als anionisches Detergenz die Eigenladung der Proteine überdeckt.

Zusätzlich muss der Laufpuffer vorbereitet werden. Dazu wird 50ml NuPage[®] MES- oder MOPS-Puffer mit 950ml Aqua bidest verdünnt. Davon werden 200ml mit 500µl Antioxidant versetzt und für die innere Kammer der Western Blot-Apparatur verwendet. Der Rest bleibt für die äußere Kammer. NuPage[®] Gele (10% Acrylamidgehalt, für SDS-denaturierte Proteine von 16-70kDa) werden mit Aqua bidest. abgespült und in der inneren Kammer fixiert. Die Gele bestehen im Allgemeinen aus einem Sammel- und einem Trenngel. Im Sammelgel wird durch unterschiedliche Mobilität von Ionen im Gel- und im Elektrophoresepuffer eine Vortrennung und Konzentrierung der Proteine erreicht. Im Trenngel wird dies noch durch eine geringe Porenweite, einen höheren pH-Wert und Salzgehalt verstärkt.

Die innere Kammer wird mit 150ml Laufpuffer mit Antioxidant befüllt, wobei sich der Flüssigkeitsstand 3mm über dem oberen Ende der Slots befinden sollte. Nach einer Überprüfung der Dichtigkeit der inneren Kammer, wird die äußere Kammer mit ca. 600ml Laufpuffer befüllt. Dabei sollte der Flüssigkeitsstand 1cm unterhalb des oberen Randes der Kammer sein. Anschließend werden die Taschen mit 15µl der vorbereiteten Probe (s. o.) bzw. mit 10µl Marker gefüllt. Die Elektrophorese sollte 45-60 Minuten (bei 200V, 250mA und 25OW) dauern, bis die unterste blaue Linie das Ende des Gels erreicht hat. Anschließend erfolgt das Blotten (Übertragen auf eine Membran). Man kann eine Nylon-, Polyvinylidenfluorid- oder Nitrocellulosemembran verwenden. Dabei ist das Blotten mit Nitrocellulose die gängigste Methode.

4.8.2 Transfer und Coomassie-Färbung

Zunächst wird der Transferpuffer vorbereitet und die Blotting Pads sowie die Membran und die Filterpapiere damit eingeweicht. Anschließend wird das Blotting Sandwich geschichtet. Zuerst wird ein Filterpapier auf eine ebene Fläche gelegt. Danach wird das Gel aufgelegt. Dann werden eine Membran und ein weiteres Filterpapier auf das Gel platziert.

Danach werden die Luftblasen aus dem Sandwich entfernt, indem eine Glaspipette über dem Sandwich gerollt wird. Anschließend wird das Sandwich mit Hilfe der eingeweichten Pads im Blot-Modul fixiert. Dabei werden die Pads auf beiden Seiten außen an das Sandwich platziert. Dann wird das Blot-Modul in die Apparatur gespannt und die innere Kammer mit Transferpuffer gefüllt, so dass das Sandwich bedeckt ist. Die äußere Kammer wird danach mit 650ml Aqua bidest. gefüllt. Das Blotting der Membran erfolgt bei 30V, 250mA für 60 Minuten. Anschließend werden überschüssige Proteinbindungsstellen auf der Membran mit Magermilchpulver, BSA oder GE Healthcare Amersham ECLTM Blocking Agent in PBS über Nacht abgesättigt („blockiert“). Dieses Verfahren reduziert falsch positive Ergebnisse und somit den Hintergrund.

Das Gel kann über Nacht mit Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung eingefärbt werden. Der Farbstoff bindet sich als blauer Komplex unspezifisch an fast alle Proteine mit einer Konzentration von 0,1-2µg. Anschließend wird die Färbelösung abgossen (Sie kann mehrfach benutzt werden.) und das Gel mit Entfärbelösung auf dem Schüttler über Nacht entfärbt, um den Hintergrund zu reduzieren.

4.8.3 Nachweisreaktion

Am nächsten Tag wird die Membran einmal kurz und dreimal fünf Minuten in PBS-Waschpuffer ohne Tween gewaschen (200ml PBS Puffer und 2g BSA). Danach wird die Membran je nach Probenzusammensetzung zerschnitten und die Stücke mit den unterschiedlichen Proben in verschiedene Antikörperlösungen überführt. Als Negativkontrolle kann ein IgG-Antikörper verwendet werden.

Die Antikörper werden in PBS-Waschpuffer mit Tween (100ml PBS Puffer, 1g BSA, 100µl Tween 20) verdünnt. Die Membranen werden über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird einmal kurz und dreimal fünf Minuten in PBS-Waschpuffer mit Tween gewaschen. Je nach Methode, mit der entwickelt wird, kann ein weiterer, sogenannter Brücken- oder Verstärkerantikörper notwendig sein. Dieser und jeder weitere Antikörper wird ebenfalls in PBS-Waschpuffer mit Tween angesetzt und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem Antikörper ist ein Waschschrift in PBS-Waschpuffer mit Tween notwendig.

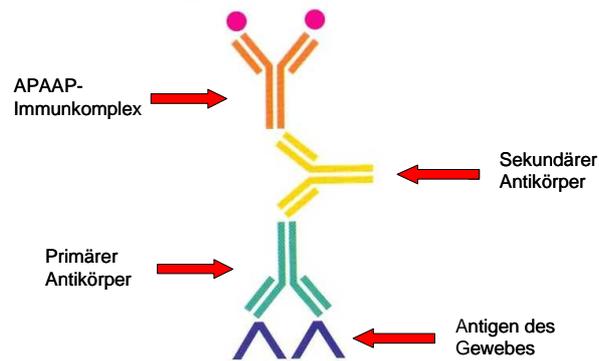


Abb. 13: Die APAAP-Methode. Der APAAP-Immunkomplex reagiert mit dem Sekundärantikörper, der wiederum mit dem Primärantikörper reagiert. Der Primärantikörper und der Antikörper des Immunkomplexes müssen von derselben Spezies stammen (verändert nach Boenisch, 2006; Dako).

Bei einer Amplifizierung mit einem APAAP-Antikörper (unmarkierte alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase-Technik, **Abb. 13**; Mason et al., 1981; Cordell et al., 1984) wird dieser in Tris-Waschpuffer (1:500) verdünnt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgen Waschschrte mit 1x NTB-Puffer (dreimal fünf Minuten). Dann erfolgt das Entwickeln fünf bis 20 Minuten mit NBT/BICP. Es sollte möglichst im Dunkeln entwickelt werden, da der Farbstoff lichtempfindlich ist. Zum Abstoppen der Reaktion wird zweimal fünf Minuten in Aqua bidest. gewaschen. Abschließend wird die Membran im Trockenschrank bei 37°C getrocknet. Die Membran sollte im Dunkeln aufbewahrt werden, da sie mit der Zeit verblasst.

4.9 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunpräzipitation ist eine Methode zur Charakterisierung von DNA-Bindeproteinen (z. B. Transkriptionsfaktoren, Histonen, Protaminen) und der von ihnen gebundenen DNA-Elemente (z. B. Promotoren, Enhancer, Silencer) aus lebenden Zellen oder Geweben (Ausubel et al., 1999; Orlando et al., 1997; Orlando 2000) (**Abb. 14**).

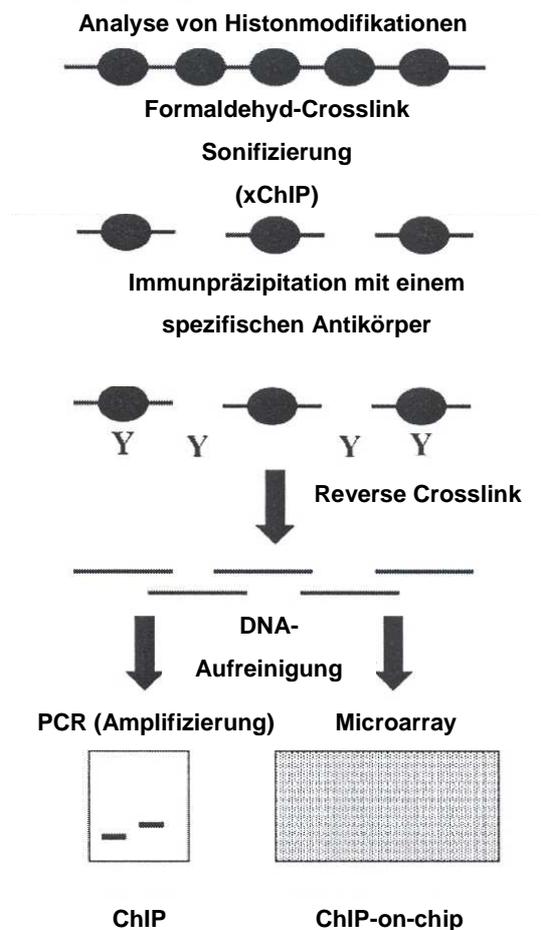


Abb. 14: Schematische Darstellung zur Untersuchung von epigenetischen Histonmodifikationen mit Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) und Microarray (ChIP-on-Chip) (verändert nach Biermann und Steger, 1999).

4.9.1 Chromatin Immunpräzipitation mit Ejakulat

Die Chromatin Immunpräzipitation wird mit dem ChIP Assay Kit (upstate) weitestgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. Das verwendete Ejakulat (ca. 60 Mio. Zellen pro Versuch) wird in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagert.

Zunächst wird das Chromatin aus Spermien isoliert und in Fragmente zwischen 200 und 1.000 Basenpaaren zerlegt. Dazu wird 1ml Ejakulat zehn Minuten bei 4.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 3ml PBS-Gemisch (10ml PBS mit einer Tablette Protease-Inhibitoren, Roche) versetzt. Das Pellet wird resuspendiert und fünf Minuten bei 4.000rpm und 4°C gewaschen.

Anschließend wird das Pellet nochmals mit 3ml PBS-Gemisch fünf Minuten bei 4.000rpm und 4°C gewaschen. Der Überstand wird jeweils verworfen. Dann wird das Pellet in 3ml PBS-Gemisch homogenisiert und anschließend mit PBS-Gemisch auf 10ml aufgefüllt.

Zum *Crosslink* (Fixierung der Proteinbindung an die DNA) wird das Gemisch mit 270µl 37%igem Formaldehyd versetzt und 15 Minuten schüttelnd inkubiert. Zum Abstoppen wird das Gemisch mit 0,016g Glycin fünf Minuten inkubiert. Danach wird zehn Minuten bei 4.000rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 2ml PBS-Gemisch fünf Minuten bei 4.000rpm und 4°C gewaschen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 1ml SDS-Lysis-Puffer (mit Protease-Inhibitoren) versetzt.

Die Probe wird zehn mal zehn Sekunden auf Eis sonifiziert. Zwischen den zehn Pulsen erfolgen jeweils 30 Sekunden Pause. Die Probe darf während des Sonifizierens nicht schäumen. Dann wird die Probe in ein Eppendorfggefäß überführt und zehn Minuten bei 18.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfggefäß überführt und kann bei -20°C gelagert werden.

Mit 10-200µl Überstand wird ein Chromatin-Check (**Abb. 15**) durchgeführt. Zu dem Überstand wird 10µl 5M NaCl gegeben und über Nacht bei 65°C zum *Reverse-Crosslink* inkubiert. Am nächsten Tag wird das Gemisch mit 4µl 0,5M EDTA, 8µl 1M Tris-HCl, pH6,5 und 2µl Proteinase K (10mg/ml) vier Stunden bei 45°C inkubiert. Anschließend wird das Gemisch mit 1µl RNase A eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-fällung durchgeführt (s. 4.10.3, S. 80).

Dann wird die DNA-Probe auf ein Gel aufgetragen. Entspricht die Fragmentlänge 200-1.000bp kann der eingefrorene Überstand verwendet werden. Dazu wird er zehnfach mit Dilutionspuffer (versetzt mit Protease-Inhibitoren) verdünnt.

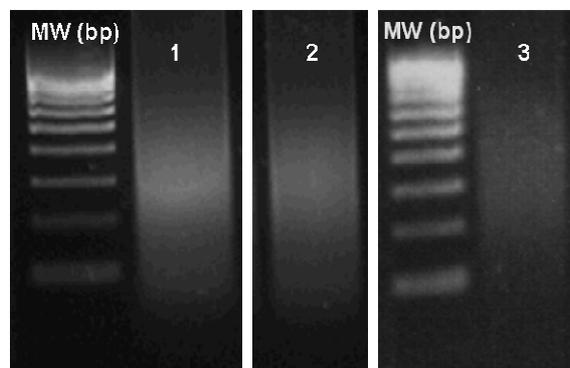


Abb. 15: Chromatin-Check nach dem Sonifizieren von HeLa- (1), Prostata- (2) und Spermien- (3) Chromatin. Der Standard hat die Größenordnung von 100-1.000bp. Alle Proben zeigen DNA im gewünschten Spektrum von 200-1.000bp.

Dann wird eine Proteinkonzentrationsmessung in Form eines Bradford-Assays durchgeführt. Die Konzentration sollte ca. 500ng/µl betragen. Gegebenenfalls muss die Probe noch einmal mit 1/10 Lysispuffer und 9/10 Dilutionspuffer verdünnt werden, um alle Proben auf die gleiche Konzentration einzustellen.

Anschließend wird pro Immunpräzipitat 1ml verdünnter Zellüberstand verwendet. Für den Input wird 100µl Zellüberstand (10%) zurückgehalten und bei -20°C aufbewahrt. Zu dem 1ml Zellüberstand wird jeweils 40µl Protein-A Agarose/Salmon Sperm DNA pipettiert und für 30 Minuten bei 4°C schüttelnd inkubiert, um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren. Das Gemisch wird anschließend eine Minute bei 1.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Danach wird der Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Die Menge variiert von Antikörper zu Antikörper (s. Antikörper, 3.5, S. 44). Als Negativkontrolle wird ein Antikörper gegen unspezifische Immunglobuline (IgG) verwendet.

Am nächsten Tag wird zu jeder Probe 60µl Protein-A Agarose/Salmon Sperm DNA hinzugegeben und eine Stunde bei 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wird eine Minute bei 1.000rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet für je fünf Minuten in folgenden Puffern (1ml) schüttelnd gewaschen: 1x *Low Salt Immune Complex Wash Buffer*, 1x *High Salt Immune Complex Wash Buffer*, 1x *LiCl Immune Complex Wash Buffer*, 2x *TE Buffer*. Zwischen den Waschrufen wird jeweils eine Minute bei 1.000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Dann wird Elutionspuffer frisch angesetzt: 1%iges SDS (0,1g) und 0,1M NaHCO₃ (0,084g) in 10ml Aqua bidest.. Der Histonkomplex wird mit 250µl Elutionspuffer eluiert und dafür 15 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Dann wird eine Minute bei 1.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Eluation wird wiederholt und beide Überstände kombiniert (ca. 500µl). Zum Aufheben der Histon-DNA-Crosslinks wird zum Überstand jeder Probe 20µl 5M NaCl hinzu gegeben. Zusätzlich wird die Input-Probe aufgetaut und mit 5µl 5M NaCl versetzt. Alle Proben werden über Nacht bei 65°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird zu den Immunpräzipitaten je 10µl 0,5M EDTA, 20µl 1M Tris-HCl, pH 6,5 und 10µl Proteinase K (10mg/ml) gegeben und zum Input 2µl 0,5M EDTA, 4µl 1M Tris-HCl, pH 6,5 und 2µl Proteinase K (10mg/ml). Die Proben werden mit dem Vortexer gemischt und für eine Stunde bei 45°C inkubiert. Dann werden die Proben mit 1µl RNase A eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgen eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-fällung der DNA. Zum Schluss sollte zur Überprüfung des DNA-Gehaltes eine Messung am NanoDrop-Gerät erfolgen.

4.9.2 Chromatin Immunpräzipitation mit HeLa-Zellen

Die Chromatin Immunpräzipitation wird mit dem ChIP Assay Kit (upstate) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wird eine Platte mit HeLa-Zellen (ca. 60 Mio.) aus dem Brutschrank entnommen und das Medium abgezogen. Die Zellen werden in 20ml PBS (Raumtemperatur) resuspendiert. Zum *Crosslink* wird 540µl 35%iges Formaldehyd hinzu gegeben und 15 Minuten inkubiert. Zum Abstoppen wird 0,032g Glycin zu den Zellen gegeben und fünf Minuten inkubiert. Anschließend werden die Zellen abgeschabt und in ein 15ml Falcon überführt. Dann werden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und jeweils vier Minuten bei 4.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 1ml Lysispuffer resuspendiert und fünfmal für zehn Sekunden sonifiziert, mit jeweils 20-30 Sekunden Pause dazwischen. Alle nachfolgenden Schritte sind mit denen von Ejakulatproben (s. 4.9.1, S. 75) identisch.

4.9.3 Chromatin Immunpräzipitation mit Prostata-Gewebe

Die Prostata-Gewebeproben wurden direkt nach der Operation mit dem Ultra-Turrax-Gerät zerkleinert, *crosslinked* (s. ChIP mit Ejakulat, 4.9.1, S. 75) und dann bei -80°C gelagert. Für jeden Versuch wurde 100mg Gewebe verwendet, um vergleichbare DNA-Mengen zu erhalten. Zusätzlich wurde der Protein-Gehalt nach Bradford gemessen (s. Bradford-Protein-Messung, 4.5.2, S. 69) und die Proben dem entsprechend mit ChIP-Dilutionspuffer (9/10) und -Lysispuffer (1/10) auf die gleichen Konzentrationen verdünnt (Paradowska et al., 2009).

4.10 DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA-Proben kann mit Hilfe verschiedener Kits oder mit Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung erfolgen.

4.10.1 Der QiaQuick-Aufreinigungskit

Das Herstellerprotokoll (Qiagen) wird wie folgt modifiziert: PB-Puffer (für genomische DNA) oder PN-Puffer (für cDNA) wird in einem Verhältnis von 5:1 zu den Proben gegeben. Das Gemisch wird in ein 1,5ml Eppendorfgefäß mit Säule überführt. Anschließend wird eine Minute bei 13.000rpm (gDNA) oder 6.000rpm (cDNA) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wird 750µl PE-Puffer zu den Proben gegeben und nochmals eine Minute bei 13.000rpm (gDNA) bzw. 6.000rpm (cDNA) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und es wird noch einmal zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und 30µl Aqua bidest. auf die Membran gegeben. Die Säule wird eine Minute stehen gelassen und anschließend eine Minute bei 13.000rpm (gDNA) bzw. 6.000rpm (cDNA) zentrifugiert. Danach wird das Eluat noch einmal durch die Säule laufen gelassen und nach einer Minute abermals zentrifugiert. Das Eluat enthält nun gelöste gDNA bzw. cDNA.

4.10.2 Der Illustra GFX PCR, DNA- und Gelbanden-Aufreinigungskit

Zunächst wird 500-550µl *Capture*-Puffer 3 zu 100µl Probe gegeben und vermischt (bei DNA-Fragmenten kleiner als 5kb). Die Probe sollte sich gelb bis orange färben (Indikator für den pH-Wert). Wenn die Probe eine dunkelrote oder violette Farbe annimmt, sollten 10µl 3M Natriumacetat, pH 5,0 hinzu gegeben werden. Danach sollte sich die Farbe der Probe in gelb oder orange verändern. Danach wird die Probe auf die Säule in einem Eppendorfgefäß gegeben und für 30 Sekunden bei 13.000rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Durchfluss verworfen und 500µl Waschpuffer Typ 1 hinzugegeben. Dann wird die Probe abermals für 30 Sekunden bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Waschschrift sollte einmal wiederholt werden. Zwischendurch sollte der Durchfluss verworfen werden. Anschließend wird die Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dann wird 30µl Aqua bidest. auf die Säule gegeben und für eine Minute inkubiert. Danach wird die Probe eine Minute bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss enthält die aufgereinigte DNA.

4.10.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Probe wird, wenn sie nicht schon 200µl umfasst, mit Aqua bidest. auf 200µl verdünnt und anschließend mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und eine Minute mit dem Vortexer gemischt. Dann erfolgt die Phasentrennung durch eine Zentrifugation für eine Minute bei 13.000rpm. Die wässrige Phase wird danach in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wird eine Ethanolfällung durchgeführt.

4.10.3.2 Ethanolfällung von DNA

Die DNA-Lösung wird zur Fällung mit 0,1 Volumen 3M Na-Acetat, pH 4-5; 2-3 Volumen 100%igem Ethanol und 3µl Glykogen versetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei -20°C oder für eine Stunde bei -80°C. Anschließend wird das Gemisch für 30 Minuten bei 15.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wird das Pellet (die DNA) mit kaltem 70%igem Ethanol zehn Minuten bei 15.000rpm gewaschen. Die DNA wird bei 37°C getrocknet. Anschließend wird die DNA in Aqua bidest. (20-50µl) gelöst und kann bei -20°C gelagert werden.

4.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) zum Amplifizieren von DNA-Sequenzen

Mittels PCR ist es möglich, definierte DNA-Bereiche *in vitro* zu amplifizieren (Saiki et al., 1988). Der DNA-Bereich wird durch zwei Primer (kurze, gegenläufige Oligonukleotide) festgelegt. Ein Zyklus der PCR besteht aus folgenden Schritten: Denaturierung der DNA, Annealing (Primerbindung) und Polymerisation (Synthetisieren der Zielsequenz). Der Zyklus wird häufig wiederholt (mind. 30mal) und bei optimalem Verlauf verdoppelt sich pro Zyklus die Anzahl der gewünschten DNA-Moleküle.

Beim Pipettieren sollte das Enzym immer auf Eis stehen bleiben und zuletzt hinzu gegeben werden. Der Ansatz sollte durch Auf- und Abpipettieren gemischt werden. Luftblasen im Gemisch sollten vermieden werden und gegebenenfalls sollte der Ansatz kurz bei niedriger Drehzahl zentrifugiert werden.

4.11.1 Primer-Generierung

Das Gelingen einer PCR hängt davon ab, wie gut die verwendeten Primer sind. Sie bestimmen Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR. Bei der Generierung von Primern sollten daher folgende Parameter berücksichtigt werden: die Schmelztemperatur [= $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$; nach Thein, 1986], die 3'-Enden, die Nukleotidzusammensetzung und -verteilung (GC-Gehalt 40-60%), sowie Primer-Wechselwirkungen. Zum Beispiel sollten beide Primer dieselbe Schmelztemperatur besitzen. Außerdem sollte ein Primer keine stabilen Sekundärstrukturen oder Dimere bilden. Deswegen sollten Komplementaritäten innerhalb eines Primers und zwischen den Primern vermieden werden.

In dieser Studie wurden zur Primer-Generierung die Internet-Programme *Primer 3*, *Oligonucleotide Properties Calculator* und *NCBI Primer BLAST* (s. Material, 3.11, S. 57) verwendet.

4.11.2 Semiquantitative PCR

Bei der semiquantitativen PCR wird eine Input-Verdünnungsreihe und/oder dieselbe Menge an DNA in verschiedenen Proben verwendet, um die Anreicherung verschiedener Proben im Verhältnis zum Input oder untereinander zu vergleichen.

Gleichzeitig kann mit der Verdünnungsreihe die optimale PCR-Zyklen-Anzahl ermittelt werden, da die Verdünnungsreihe auf dem Gel eine deutliche Abstufung zeigen sollte.

Eine semiquantitative PCR wird nach folgendem Schema pipettiert:

2,5µl 10x Puffer
0,75µl MgCl ₂ (1,5mM)
0,5µl dNTPs (10mM jedes)
1µl Primer <i>forward</i> (10pmol/µl)
1µl Primer <i>reverse</i> (10pmol/µl)
0,1µl <i>Taq</i> Polymerase
17,6-18,6µl H ₂ O, RNase frei
1-2,0µl <i>Template</i> DNA
Σ 25µl

Zur Optimierung der PCR und zur Reduzierung unspezifischer Produkte kann Betain in der Konzentration 0,8-1,6M in die PCR eingesetzt werden.

PCR-Ablauf:

1x	94°C, 3 min., Denaturierung
35x	94°C, 1 min., Denaturierung
„ „	52°C-65°C, 30 sek.-1 min., Annealing, Temperatur ist primerspezifisch, (Anzahl an C/G- und A/T-Bindungen)
„ „	72°C, 1-2 min., für <i>Taq</i> Polymerase (Die Temperatur hängt von der Polymerase ab.), Polymerisation
1x	72°C, 5-10 min., Auffüllen freier Enden, Elongation
1x	4°C, ∞, Abkühlen bis zum manuellen Stop

4.11.3 Real time PCR für ChIP

Bei einer real time PCR werden die PCR-Produkte bei ihrer Bildung in speziellen Thermocyclern erfasst (in Echtzeit). Dazu werden DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green I verwendet, die sich in die doppelsträngige DNA lagern. Dabei besteht das Problem, dass sich dieser Farbstoff auch an unspezifische Produkte und Primerdimere lagert.

Für eine real time PCR müssen Primer verwendet werden, die kein größeres Produkt als ca. 200bp amplifizieren, weil die PCR „in Echtzeit“ sonst nicht funktioniert.

Die real time PCR wird nach folgendem Schema pipettiert:

0,5µl Primer <i>forward</i> (10pmol/µl)
0,5µl Primer <i>reverse</i> (10pmol/µl)
12,5µl CyberGreen Mastermix
9,5-10,5µl H ₂ O, RNase frei
1-2,0µl <i>Template</i> DNA (hier immunpräzipitierte DNA)
Σ 25µl

Bei mehreren Proben wird ein Mastermix hergestellt. Pro PCR werden zwei Negativkontrollen mitlaufen gelassen. Eine enthält statt DNA Aqua bidest. und die andere nur den Mastermix ohne *Template* zum Überprüfen, ob die Primerverdünnungen oder der Mastermix Verunreinigungen enthalten.

PCR-Ablauf:

1x	95°C, 3 min., Denaturierung
40x	95°C, 30 sek., Denaturierung
„ „	55°C-65°C, 30 sek.-1 min., Annealing, Temperatur ist primerspezifisch, (Anzahl an C/G- und A/T-Bindungen)
„ „	72°C, 1 min. (Der CyberGreen Mastermix enthält eine <i>Taq</i> Polymerase. Die Temperatur hängt von der Polymerase ab.), Polymerisation
1x	55°C, 10 sek., Vorbereitung auf die Schmelzkurve
80x	55°C-95°C in 0,5°C Schritten für je 10 sek., Schmelzkurve

Gradient zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur:

1x	95°C, 3 min., Denaturierung
40x	62°C-55°C für 45 sek. (jedes <i>Well</i> erhält eine andere Temperatur zwischen 62 und 55°C), Annealing

4.11.4 Statistische Analyse von real time PCR

Die Berechnungen zur real time PCR werden nach folgender Formel durchgeführt. Dabei spielt der *Cycle Threshold* (CT)-Wert eine entscheidende Rolle. Er ist die Zykluszahl, bei der jede PCR-Reaktion einen vorgegebenen Fluoreszenz-Grenzwert erreicht. Er wird innerhalb der loglinearen Phase aller Reaktionen gesetzt.

Mit Hilfe des CT-Wertes wird die Anreicherung des PCR-Produkts einer immunpräzipitierten Probe im Verhältnis zum Input-Chromatin berechnet: $\Delta Ct = Ct(\text{Input}) - Ct(\text{immunpräzipitierte Probe})$ und für die Anreicherung (%) gilt: $2^{\Delta Ct} \times 10$ (10, da 10% Input Chromatin des gesamten Chromatin-Materials verwendet wurde) (Frank et al., 2001). Bei immunpräzipitierten Proben von fertilen Männern wurden die CT-Werte von mehreren Spendern verwendet und der Mittelwert aller Anreicherungs-werte berechnet. Bei infertilen Patienten wurden immunpräzipitierte Proben von fünf oder sechs Männern *gepoolt* und der Anreicherungs-Mittelwert von mehreren PCRs verwendet.

4.12 Agarose-Gel-Elektrophorese

Bei der Gel-Elektrophorese werden DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt (Sambrook et al., 1989). Da die DNA auf Grund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der DNA ab. Kleinere Fragmente wandern schneller als große.

Die DNA wird auf ein Agarose-Gel aufgetragen (1-2% Agarose und 1µl Ethidiumbromid auf 100ml 1x TAE-Puffer bzw. 1-2% Agarose und 3µl GelRedTM auf 30ml 1x TAE-Puffer). Nach dem Aufkochen des Gels dürfen keine Schlieren mehr zu sehen sein. Erst danach wird die abgekühlte Gelmasse mit Ethidiumbromid oder GelRedTM versetzt und in eine Kammer gegossen. Das Gel muss ca. 20 Minuten aushärten.

Ein DNA-Größenstandard z. B. Hyper Ladder IV (Bioline) (Bandengröße 100-1.000) wird als Marker und 6x DNA loading Dye (Bioline) als Probenpuffer benutzt.

Die Spannung legt man je nach Größe des Gels zwischen 70 und 120mV fest. Die Dauer liegt nach Anteil der Agarose zwischen 20 und 45 Minuten.

Mit Hilfe von Ethidiumbromid oder GelRedTM wird die DNA gefärbt. Unter UV-Licht wird die DNA durch das hellorange fluoreszierende Ethidiumbromid oder GelRedTM sichtbar gemacht.

Bei den Gelbildern dieser Arbeit wurde 25µl PCR Produkt auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen.

4.13 WGA (*Whole Genome Amplification*) und Reamplifizierung von DNA

Bei der WGA (O'Geen et al., 2006) würde in einem ersten Schritt die DNA fragmentiert. Da ChIP-Proben bereits fragmentiert sind, fällt dieser Schritt weg.

Die Konzentration der isolierten DNA wird bei einer UV-Absorption von 260nm gemessen. Anschließend wird 10µl DNA-Lösung mit einer Konzentration von 1ng/µl hergestellt. Die Durchführung erfolgt mit dem Genome Plex Complete Amplification Kit (Sigma) nach Angaben des Herstellers:

Zunächst werden 2µl 1x *Library Preparation Puffer* zu jeder Probe pipettiert. Anschließend folgt die Zugabe von 1µl *Library Stabilization Solution*. Dann wird gemischt, abzentrifugiert und die Probe für zwei Minuten bei 95°C im Thermocycler inkubiert. Danach wird die Probe abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Es folgt die Zugabe von 1µl *Library Preparation Enzyme*. Nach dem Mischen wird kurz abzentrifugiert und die Proben im Thermocycler nach folgendem Schema inkubiert:

16°C für 20 Minuten
24°C für 20 Minuten
37°C für 20 Minuten
75°C für 5 Minuten
4°C bis zum manuellen Stop

Die Proben können nach diesem Schritt direkt amplifiziert oder für drei Tage bei -20°C gelagert werden. Zur Amplifikation werden folgende Reagenzien zu 15µl Probe pipettiert: 7,5µl 10x *Amplification Master Mix*, 47,5 µl Nuklease-freies Wasser und 5 µl WGA DNA Polymerase. Anschließend müssen die Proben gemischt und abzentrifugiert werden. Danach werden sie mit folgenden Schritten im Thermocycler amplifiziert:

1x	95°C für 3 Minuten, Denaturierung
14x	94°C für 15 Sekunden, Denaturierung
14x	65°C für 5 Minuten, Annealing, Elongation

Nach diesem Schritt kann die DNA bis zur Aufreinigung bei 4°C oder länger bei -20°C gelagert werden. Nach der Aufreinigung kann die DNA reamplifiziert werden (Sigma, Genome Plex Complete Amplification Kit oder Genome Plex WGA Reamplification Kit). Dabei wird der Amplifizierungsschritt wiederholt.

Um zu testen, ob die DNA nach der WGA oder Reamplifizierung ihre Qualität behalten hat und sich das DNA-Fragmentspektrum nicht verschoben hat, wird die DNA erneut aufs Gel aufgetragen (Vergleich zum Chromatin-Check, s. ChIP, 4.9.1, S. 75) und eine Test-PCR mit Primern durchgeführt, die gut mit ChIP-Material funktioniert haben (**Abb. 16**).

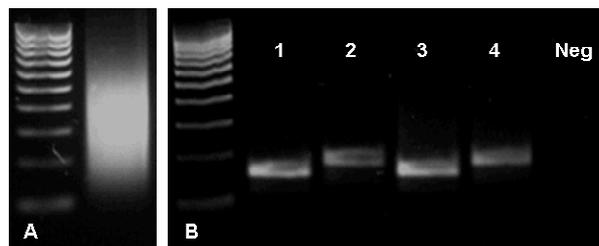


Abb. 16: Beispiel für einen Spermien-Chromatin-Check nach der WGA. A zeigt Input-DNA nach der WGA. Die DNA-Fragmente haben nach wie vor das gewünschte Spektrum von 200-1.000bp. B zeigt PCR-Produkte von Input-DNA mit den Primern *CRAT* (1,3) und *INHA*-Promotor (2,4) vor der WGA (1,2) und nach der WGA (3,4), wobei die *Template* DNA auf dieselbe Konzentration (10ng/μl) eingestellt wurde. Neg = Negativkontrolle mit Wasser als *Template*.

4.14 DNA-Microarrays

Bei einem DNA-Microarray sind Nukleinsäuremoleküle (Sonden) in einer Matrix auf einer Membran oder einem Glasträger angeordnet. Die zu untersuchenden Nukleinsäuren werden fluoreszenzmarkiert und mit den Sonden hybridisiert. Durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe können mehrere Zielmoleküle auf einem Array untersucht werden, da die Signale getrennt detektiert werden können (**Abb. 17**). Durch diesen Versuchsaufbau können viele DNA-Moleküle gleichzeitig und auf kleinstem Raum analysiert werden.

Die Anwendungsmöglichkeiten von Microarrays sind vielseitig. So können z. B. Genexpressionsanalysen durchgeführt werden, Moleküle in Signalkaskaden identifiziert werden oder der Einfluss eines Gens oder Proteins auf die Expression von Zielmolekülen untersucht werden.

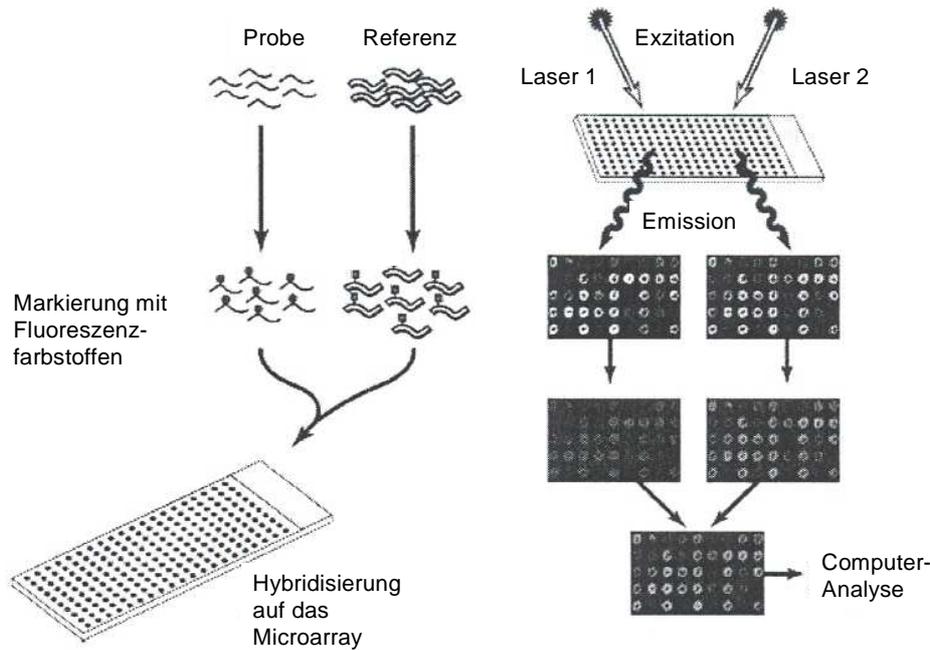


Abb. 17: Übersicht über den Ablauf eines Microarray-Experiments. Die zu untersuchende Probe und die Referenz-DNA werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf ein Microarray mit speziell ausgewählten Sonden hybridisiert. Anschließend werden die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe mittels zwei verschiedenen Lasern angeregt und die Emission gemessen. Die Emissionswerte werden danach am Computer ausgewertet (verändert nach Duggan et al., 1999).

4.14.1 Die ENCODE-Regionen

Da im Rahmen dieses Projektes ein ENCODE-Microarray durchgeführt werden sollte, wird zunächst der Hintergrund der ENCODE-Sequenzen erklärt.

Das *National Human Genome Research Institute* (NHGRI; Bethesda, MD, U.S.A) gründete im September 2003 eine öffentliche Forschungsgemeinschaft mit der Bezeichnung ENCODE (*ENCyclopedia Of DNA Elements*) und dem Ziel, alle funktionalen Elemente der menschlichen Genom-Sequenz zu identifizieren. Das Projekt wurde in zwei Teilschritte gegliedert, eine Pilotphase und eine Technologie-Entwicklungsphase. In der Pilotphase wurden zunächst verschiedene Analyse-Methoden für die menschliche Genomsequenz getestet. Die Ergebnisse dieses Projektes wurden im Juni 2007 in *Nature* und *Genome Research* veröffentlicht. In der Technologie-Entwicklungsphase wurden neue Methoden zur Daten-Generierung entwickelt. Im September 2007 wurden dann neue Ziele festgelegt, um die Produktionsphase des Projektes einzuleiten. Es wurden Experten aus verschiedenen Bereichen in das Projekt einbezogen.

Die Produktionsphase beinhaltete auch ein Daten-Koordinierungszentrum, um alle Daten aufzubereiten und miteinander zu vergleichen. Die Ergebnisse aller Beteiligten wurden in öffentlichen Datenbanken publiziert und Sequenz-bezogene Daten auf dem Browser der Universität von Californien, Santa Cruz (UCSC) visualisiert. Weitere Daten sind auf *Gene Expression Omnibus (Geo)* oder auf *ArrayExpress* zu finden.

4.14.2 Das ENCODE-Array

Die Firma imaGenes (NimbleGen-Service) bietet verschiedene ENCODE-Arrays an. In unserer Studie wurde ein HG18 Human ENCODE CHIP verwendet, der alle ENCODE-Regionen berücksichtigt (Vgl. UCSC). Der NimbleGen-Service beinhaltet neben der Herstellung des Arrays auch Qualitätskontrollen, die Markierung des Inputs und der immunpräzipitierten Probe, die Hybridisierung, das Scannen, die Daten-Erstellung und die erste Datenanalyse.

Das Array befindet sich auf einem (Glas)träger und beinhaltet 135.000 Sonden. Die Größe der Sondenmoleküle beträgt 50-75mer, der mittlere Sondenabstand 60bp. Die Nukleinsäuren, die an den Input bzw. H3K9ac gekoppelt waren, werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies sind Cyanin 3 und Cyanin 5, die unterschiedliche Emissionsspektren besitzen (550 bzw. 649nm).

Das Signal von H3K9ac-Nukleinsäuren gegenüber dem von Input-Nukleinsäuren jeder Position auf dem Träger wird mittels eines Lasers ausgelesen und danach verglichen. Da Cyanin 5 gegenüber Cyanin 3 schlechter eingebaut wird, müssen die Array-Daten anschließend normalisiert werden. Eine Normalisierung ist auch auf Grund von unterschiedlich guten Extraktionen, Sondenmengen, Fluoreszenzintensitäten und anderen Aspekten notwendig.

Für die Durchführung des Arrays müssen die Proben wie folgt präpariert werden:

Die Proben müssen mit dem QiaQuick PCR Aufreinigungskit (Qiagen) aufgereinigt werden. Die Gesamtmenge an DNA für Input und immunpräzipitierte Probe muss jeweils mindestens 4µg betragen mit einer Konzentration von 100-500ng/µl. Die Proben müssen in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert werden. Die optische Dichte bei 260/280nm muss mindestens 1,7 betragen. Die DNA-Qualität muss durch Gel-Elektrophorese oder den Agilent Bioanalyzer überprüft werden, ob keine Degradation vorliegt. Zusätzlich wird die Qualität der DNA noch einmal von imaGenes überprüft.

Von den fertigen Rohdaten werden GFF (*General Feature Format*)-Dateien erstellt, die mit dem Programm SignalMap (NimbleGen) visualisiert werden können. ImaGenes liefert nach der Durchführung des Experiments eine CD mit Daten. Folgende Daten sind auf der CD enthalten:

- Eine Text-Datei beschreibt die Signalintensität in Form von Rohdaten.
- Des Weiteren gibt es eine Datei mit skalierten \log_2 -Raten jedes Abschnitts auf dem Array. Die Rate gibt das Verhältnis von Input Signal zu der getesteten Probe wieder, die auf dem Array hybridisiert wurden. Die \log_2 -Rate wurde gewählt, um alle Werte um Null zu gruppieren.



Abb. 18: Beispiel für die Datenvisualisierung mittels SignalMap (NimbleGen). Gezeigt ist ein Teil der genomischen Region des *FLNA*-Gens. Die oberste Zeile zeigt die Original-Signale in grün, die zweite Zeile ein vorhandenes primäres Transkript in blau, die dritte Zeile den untersuchten Bereich in violett, die vierte Zeile Transkriptionsstarts in Form von Balken und die fünfte Zeile die Peak-Werte in einem Farbcode (Balken) nach der FDR.

- Zusätzlich werden Peak-Dateien erstellt. Ein Peak gibt vier oder mehr *Features* wieder, deren Signale über einem bestimmten Grenzwert und innerhalb eines 500bp-Fensters liegen. Der Grenzwert ist ein hypothetisches Maximum, festgelegt als der Mittelwert zuzüglich 6 (Standardabweichung). Die Raten wurden 20fach umgerechnet, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Zu jedem Peak wurde dann eine *False Discovery Rate* (FDR) basierend auf dieser Berechnung erstellt.

Zu der FDR ist folgendes zu beachten: Je geringer die FDR ausfällt, desto wahrscheinlicher wurde eine Proteinbindungsstelle ermittelt. Für viele Datensets liegt dieser Wert schon bei $\leq 0,05$. Werte zwischen 0,05 und 0,2 können ebenfalls für eine Bindungsstelle sprechen. Werte die über 0,2 liegen, zeigen in der Regel keine Bindungsstelle an. Die Peak-Daten können im Programm SignalMap betrachtet werden. Für die Peaks wurde folgender Farbcode gewählt: rot = FDR-Wert $\leq 0,05$; orange = FDR-Wert $\leq 0,1$; gelb = FDR-Wert $\leq 0,2$ und grau = FDR $> 0,2$ (Vgl. **Abb. 18**).

Zudem können folgende zusätzliche Informationen in SignalMap abgelesen werden:

Score	Der Peak-Wert der vierthöchsten Probe in dem Gesamt-Peak (Log_2 -Rate)
Pos	Genomische Koordinaten des Peaks
Attr	Spezifische Eigenschaften des Peaks
Color	Die Peakfarbe
Cutoff_p	Die Prozentzahl über dem Grenzwert (zwischen 90 und 15%)
Cumul_peaks	Anzahl der Peaks einer ermittelten FDR
Fdr	Die <i>False Discovery Rate</i>
Attr_2,attr_1,attr_0, etc.	Zusätzliche Informationen, z. B. bezüglich des Algorithmus

Des Weiteren werden Daten für die Promotorregionen der untersuchten Gene generiert. NimbleGen hat dabei als Promotor bei den Säugetieren einen Bereich von 5kb upstream bis 1kb downstream festgelegt. In einer Liste werden die Peaks in den Promotorregionen zusammen mit folgenden Informationen aufgeführt:

PEAK_ID	Eine Identität für jeden Peak
CHROMOSOME	Das zugehörige Chromosom zu dem Peak
PEAK_START	Die erste Base des Peaks auf dem Chromosom
PEAK-END	Die letzte Base des Peaks auf dem Chromosom
PEAK-SCORE	Die Log ₂ -Rate der vierthöchsten Sonde des Peaks
PEAK_FDR	Die <i>False Discovery Rate</i> des Peaks
FEATURE_TRACK	Der Transkriptionsstartpunkt, an dessen Stelle der <i>Feature</i> lokalisiert wurde
FEATURE_STRAND	(DNA-)Strang des Transkriptes
FEATURE_START	Die erste Base des <i>Features</i> auf dem Chromosom
FEATURE_END	Die letzte Base des <i>Features</i> auf dem Chromosom
FEATURE_TO_PEAK_DISTANCE	Mitte zur Mitte-Distanz vom Peak zum <i>Feature</i>
Name	Gensymbol des Transkriptes
Accession	Genbank-Accession-Nummer des Transkriptes
Description	Vollständiger Gen-Name des Transkriptes
Ncbi-gene-id	NCBI Entrez Gene-Identität des Transkriptes
Synonyms	Andere Synonyme für das Transkript
Parent	Die interne Identifikationsnummer des Transkriptes

Alle *Features* sind in einer GFF-Datei aufgelistet, die auf dem Genom basierende Informationen enthält. Die Datei enthält Spalten mit folgenden Informationen:

Seqname	Name des Sequenz (Chromosom oder Accession-Nummer)
Source	Die Quelle des Features (NimbleGen Programm, welches die Daten produziert).
Feature	Der <i>Feature</i> -Name
Start, end	Die genomischen Koordinaten des Features
Score	Log ₂ -Werte oder die <i>False Discovery Rate</i>
Strand	Der DNA-Strang (+ oder -)
Frame	0 zeigt an, ob der feature im Genfenster(<i>Frame</i>) liegt, Werte von 1 bis 2 geben an, um wie viele Basen der Leserahmen verschoben ist
Attribute	Zusätzliche Informationen zu dem Feature, wie Verbindungen zu externen Datenbanken

Zusätzlich gibt es eine Datei mit Informationen zum Design des Arrays. Diese enthält Daten zur Sonden-Identität, der DNA-Sequenz der Sonden, die auf dem Array synthetisiert wurde und dem Aufbau (Quadrate) des Arrays. Des Weiteren gibt es eine Datei, die genaue Informationen zu den Positionen der Sonden und den Sonden selbst (Chromosom, Position auf dem Chromosom, Länge in bp, Prozentsatz an GC etc.) auflistet.

4.15 RNA-Analyse

In einer somatischen Zelle stellt die ribosomale RNA (rRNA) 80-90% der Gesamt-RNA da, während in Spermien keine ribosomale RNA zu finden ist (Ostermeier et al., 2002). Die mRNA macht nur 2% der Gesamt-RNA einer somatischen Zelle aus (10.000-34.000 Transkripte). In Spermien dürfte dagegen der Prozentsatz auf Grund der fehlenden rRNA höher liegen.

Zur Untersuchung von Transkripten wird zunächst RNA isoliert und dann mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase-Kits der Firma Qiagen (Omniscript® und Sensiscript®) besitzen neben der RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität auch eine RNA-DNA-Hybrid-abhängige Exoribonuklease (RNase H), die RNA aus Hybridmolekülen abbaut und somit dafür sorgt, dass nur reine RNA und keine DNA umgeschrieben wird.

4.15.1 RNA-Isolierung aus Ejakulat und Hoden mit dem RNeasy Mini Kit

Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Alternativ wäre eine Isolierung mit Hilfe von Trizol denkbar.

Alle Schritte erfolgen bei Raumtemperatur. Zunächst pelletiert man die Spermien bei 4.000rpm für 10 Minuten. Der Überstand wird verworfen (Dieser Schritt entfällt bei Gewebestücken.).

Dann versetzt man den RLT-Puffer des Kits mit β -Mercaptoethanol (Lysispuffer): pro Probe 350 μ l RLT-Puffer und 3,5 μ l β -Mercaptoethanol bei Ejakulat und 600 μ l RLT-Puffer und 6 μ l β -Mercaptoethanol bei Hodengewebestücken. Anschließend wird jede Probe mit dem Ultra-Turrax-Gerät homogenisiert. Das Ultra-Turrax-Gerät muss vorher und nach jeder Probe mit NaOH, 70%igem Ethanol und DEPC-Wasser gereinigt werden. Danach werden die Proben drei Minuten bei 18.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen.

Danach wird 350 bzw. 600 μ l 70%iger Ethanol (1 Volumenanteil) hinzugegeben und gemischt. Dann wird die Probe auf eine RNeasy Mini-Säule überführt und eine Minute bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Danach wird mit 700 μ l RW1-Puffer gewaschen, indem eine Minute bei 10.000rpm zentrifugiert wird. Der Durchfluss wird verworfen und mit 500 μ l RPE-Puffer eine Minute bei 10.000rpm gewaschen. Dieser Schritt wird wiederholt, jedoch zwei Minuten gewaschen.

Anschließend wird die Säule in ein neues Eppendorfggefäß überführt und eine Minute bei 18.000rpm zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Danach wird die Säule noch einmal in ein neues Eppendorfggefäß überführt und die RNA mit 30µl RNase-freiem Wasser eluiert. Dazu wird die Säule eine Minute bei 12.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird nochmals auf die Säule gegeben und eine Minute bei 12.000rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgt der DNase-Verdau.

4.15.2 RNA-Isolierung aus Blut mit dem NucleoSpin® Tissue Kit

Zuerst wird das Blut in einem 15ml Falcon mit 3ml Ficoll überschichtet und 30 Minuten bei 18.000rpm ohne Bremse zentrifugiert. Es zeigt sich eine Schichtung in verschiedene Phasen. Der weiße Ring wird mit einer Glas-Pasteurpipette abgesaugt und in ein 2ml Eppendorfggefäß überführt. Dann wird eine Minute bei 10.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird anschließend zweimal in 500µl PBS gewaschen und jeweils eine Minute bei 10.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird danach mit 300µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) und 3,5µl β-Mecaptoethanol versetzt. Anschließend wird mit dem NucleoSpin® Tissue Kit einschließlich folgender Modifikationen fortgefahren:

Die Probe wird zehn Minuten bei 1.000rpm zentrifugiert und die Zellen anschließend in 200µl B3-Puffer resuspendiert. 25µl Proteinase K-Lösung wird hinzu gegeben und zehn bis 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wird 210µl Ethanol (96-100%) hinzu gegeben und mit dem Vortexer gemischt. Pro Probe wird eine Säule in ein Eppendorfggefäß gesteckt und die Probe auf die Säule gegeben. Die Probe wird eine Minute bei 8.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Auf die Säule wird 500µl BW-Puffer gegeben und wieder eine Minute bei 8.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Dann wird 600µl B5-Puffer auf die Säule gegeben und eine Minute bei 8.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Membran der Säule für eine Minute bei 8.000rpm getrocknet. Anschließend wird die Säule in ein neues Eppendorfggefäß platziert und 100µl vorgewärmter (70°C) Elutionspuffer BE hinzu gegeben. Das Gemisch wird eine Minute inkubiert und dann für eine Minute bei 8.000rpm zentrifugiert, um aufgereinigte RNA zu erhalten. Anschließend erfolgt der DNase-Verdau.

4.15.3 DNase-Verdau

Der DNase-Verdau dient dazu, DNA-Verunreinigungen zu entfernen und wird nach folgendem Schema pipettiert:

16µl RNA
0,5µl DNase I
2µl 10x Puffer
1,5µl Aqua bidest.
20µl Endvolumen

Die Inkubation erfolgt für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wird die DNase I zehn Minuten bei 72°C inaktiviert. Danach müssen die Proben auf Eis gestellt werden und der RNA-Gehalt kann z. B. am NanoDrop-Gerät gemessen werden. Danach können die Proben umgeschrieben und in eine Reverse-Transkriptase-PCR eingesetzt werden oder bei -80°C (einige Tage-Wochen) bzw. in flüssigem Stickstoff (Monate) aufbewahrt werden.

4.15.4 RNA-Qualitätskontrolle

Ob eine präparierte RNA nicht denaturiert und somit von guter Qualität ist, lässt sich durch denaturierende Gel-Elektrophorese feststellen. Zwei Banden für 18S (1874 Nukleotide) und 28S (4718 Nukleotide) rRNA zeigen eine intakte RNA in somatischen Zellen. Weitere Banden dazwischen und unterhalb der 18S Bande stammen von mRNA. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen der 18S und 28S Bande sollte 2:1 betragen. Bei Spermien gilt zu beachten, dass sie keine ribosomale RNA besitzen (Ostermeier et al., 2002).

Die Gel-Elektrophorese kann mit einer normalen Gel-Elektrophorese-Apparatur durchgeführt werden oder zusätzlich mit einer Analyse der Fluoreszenzintensitäten in einem Bioanalyser-Gerät.

Die Analyse mittels Bioanalyser erfolgt nach dem Protokoll des Agilent RNA 6000 Nano Assays: Zuerst wird das Gel vorbereitet. Dazu wird 550µl RNA 6000 Nano Gelmatrix in eine Säule gegeben und zehn Minuten bei 1.300rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Je 65µl des gefilterten Gels werden in ein RNase-freies Gefäß überführt und müssen innerhalb von vier Wochen aufgebraucht werden.

Anschließend wird der Gel-Dye-Mix vorbereitet. Dazu wird RNA 6000 Nano Dye-Konzentrat für 30 Minuten auf Raumtemperatur gestellt. Anschließend wird das Dye-Konzentrat für zehn Sekunden mit dem Vortexer gemischt, zentrifugiert und 1µl Dye-Konzentrat in ein 18µl Gel-Aliquot überführt. Das Gemisch wird ebenfalls mit dem Vortexer vermengt und zehn Minuten bei 10.000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der vorbereitete Gel-Dye-Mix muss innerhalb eines Tages aufgebraucht werden.

Dann wird der Gel-Dye-Mix auf einen Chip geladen. Dazu wird ein neuer RNA 6000 Nano Chip in die Chip Priming Station gelegt. 9µl Gel-Dye-Mix werden dann in das Well pipettiert, das mit einem weißen G beschriftet ist. Danach wird die Priming Station geschlossen und der Hebel an der Position 1ml platziert. Dann wird der Hebel herunter gedrückt, bis er sich unter einen Clip einhängen lässt. Nach 30 Sekunden wird der Clip gelöst. Anschließend wird fünf Sekunden gewartet und der Hebel zurück an die 1ml Position gebracht. Dann wird die Priming Station geöffnet und 9µl Gel-Dye-Mix in das Well mit einem schwarzen G gefüllt. Der übrige Gel-Dye-Mix wird verworfen. Anschließend wird 5µl Agilent RNA 6000 Nano Marker in alle zwölf Wells für die Proben und in das mit einer Leiter markiertem Well pipettiert.

Dann werden der Größenstandard und die Proben für zwei Minuten bei 70°C denaturiert. 1µl des Größenstandards wird in das Well mit der Leiter pipettiert. Ebenso wird 1µl jeder Probe in eines der zwölf Wells pipettiert und 1µl Marker in jedes unbenutzte Well. Danach wird der Chip für eine Minute bei 2.400rpm mit dem IKA-Vortexer gemischt.

Danach sollte der Chip innerhalb von fünf Minuten im Agilent 2100 Bioanalyzer gestartet werden. Damit die Messung optimal verläuft, sollte die RNA-Konzentration mindestens 50ng/µl betragen. Bei der Messung wird eine Integritäts-Nummer berechnet, bei der die Zahl 10 für eine sehr gute RNA-Qualität steht und die Zahl 1 für vollständig degradierte RNA.

4.15.5 Zwei-Schritt Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

In einer Zwei-Schritt RT-PCR wird zunächst RNA in eine komplementäre cDNA umgeschrieben (1. Schritt, Reverse Transkription). Die synthetisierte cDNA wiederum wird als *Template* in eine real time PCR eingesetzt (2. Schritt).

4.15.5.1 cDNA-Synthese (1. Schritt, Reverse Transkription)

Die cDNA wird mit Hilfe des Sensiscript[®] oder Omniscript[®] RT Kits (Qiagen) synthetisiert. Die eingesetzte *Template* RNA pro Reaktion sollte für das Sensiscript[®] Kit kleiner als 50ng und für das Omniscript[®] Kit größer als 50ng sein. Für mRNA verwendet man Oligo(dT)-Primer (12-18 Nukleotide), die im Bereich des Poly (A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisieren. Aus der Gesamt-RNA werden demnach selektiv alle mRNA-Moleküle umgeschrieben. Alternativ können auch Random-Primer (zufällige Hexanukleotide) verwendet werden, die die Menge und Komplexität der cDNA erhöhen. Es werden aber neben mRNA hierbei auch andere RNA-Typen umgeschrieben. Die Reaktion wird nach dem folgenden Schema pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert:

2,0µl 10x Puffer RT
2,0µl dNTP Mix (5mM jedes dNTP)
2,0µl Oligo(dT)-Primer (10µM)
1,0µl RNase Inhibitor (10 Units/µl)
1,0µl Sensiscript [®] /Omniscript [®] Reverse Transkriptase
4-8µl RNase-freies Wasser
4-8µl <i>Template</i> RNA
20µl Endvolumen

Die cDNA wird mit dem QiaQuick-Aufreinigungskit aufgereinigt (s. 4.10.1, S. 79) und die DNA-Konzentration anschließend am NanoDrop[®] ND-1000-Gerät gemessen (s. 4.6, S. 71).

4.15.5.2 Marker für Verunreinigungen durch somatische Zellen und unreife Keimzellen

Des Weiteren ist es möglich, die Reinheit der RNA (cDNA) mit Hilfe von Markern zu testen. cd45 stellt einen Marker für somatische Zellen (insbesondere Leukozyten) dar, während c-kit ein Marker für unreife Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten) ist (Lambard et al., 2004). Primer für diese Marker-Gene werden in semiquantitativer PCR verwendet. cDNA aus Ejakulat sollte keine Kontaminationen zeigen, während als Kontrolle cDNA aus dem Hoden und aus Leukozyten ein PCR-Produkt ergeben muss (s. Ergebnis, Abb. 28, S. 114).

4.15.5.3 Amplifikation von cDNA durch quantitative real time Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) (2. Schritt)

Bei einer quantitativen real time RT-PCR kann man Produkte aus umgeschriebener mRNA amplifizieren und somit Transkriptionsraten und die Genexpression analysieren (Pfaffl, 2001), da man aus der Menge an PCR-Produkt auf die Menge der eingesetzten cDNA schließen kann.

Eine real time RT-PCR wird nach folgendem Schema pipettiert:

0,5µl Primer <i>forward</i>
0,5µl Primer <i>reverse</i>
12,5µl iQ TM Sybr [®] Green
6,5µl Aqua bidest.
5µl cDNA (5ng/µl)
25µl Endvolumen

Die PCR läuft unter folgenden Bedingungen ab:

1x	50°C, 2 min. (UNG-Behandlung*)
1x	95°C, 1 min., Denaturierung
40x	95°C, 30 sek., Denaturierung
„ „	60°C, 1 min., Annealing
„ „	72°C, 1 min., Polymerisation
1x	55°C, 10 sek., Vorbereitung der Schmelzkurve
80x	55°C-95°C in 0,5°C Schritten für je 10 sek., Schmelzkurve

* Durch eine Uracil-N-Glycosylase-Behandlung werden dUMP (Deoxy-Uracil-Mono-Phosphat)-enthaltende PCR-Produkte (Kontaminationen) entfernt.

Folgende Referenzgene können im Ejakulat für die real time RT-PCR verwendet werden: *Heat Shock Protein (HSP)*, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)*, *Beta-Actin (ACTB)* (Vgl. **Abb. 19**) und *ATP-Synthase Subunit 5B (ATP5b)* (Cavalcanti et al., 2010, im Druck). Nach Beendigung der PCR erfolgt die statistische Analyse.

ACTB

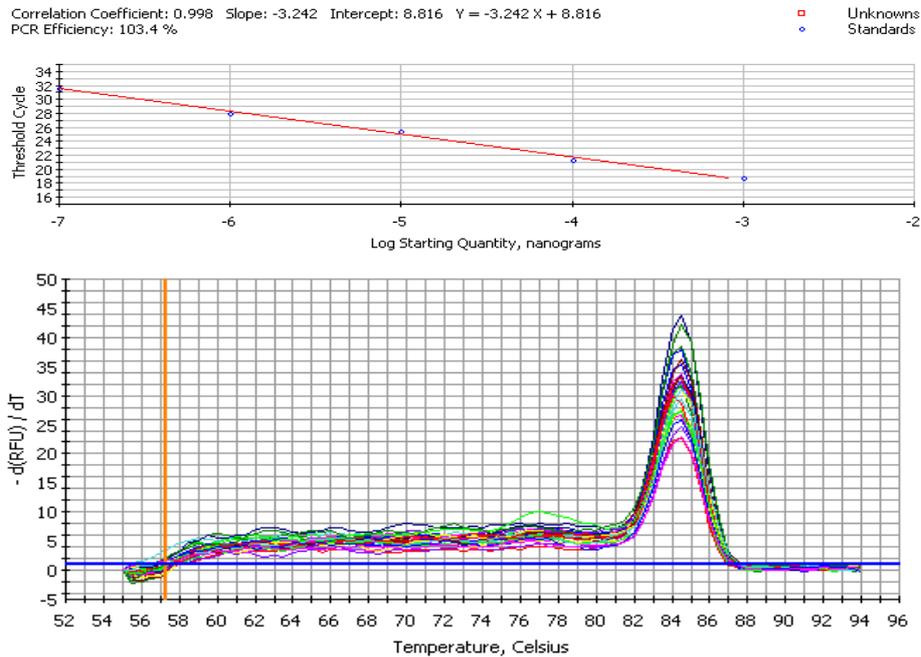


Abb. 19: Ergebnis einer quantitativen real time RT-PCR von *Beta-Actin* (*ACTB*). Im oberen Bereich ist die Standardkurve zu sehen mit einem linearen Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0,998$ und einer PCR-Effizienz von 103,4%. Im unteren Bereich ist die Schmelzkurve zu erkennen, die ein spezifisches Produkt ohne Primerdimere zeigt.

4.15.5.4 Statistische Analyse von quantitativer real time RT-PCR

Zur Beurteilung der PCR-Qualität werden die PCR-Effizienz und der lineare Korrelationskoeffizient (R^2), ein Indikator für die Standardkurve, betrachtet. Die PCR-Effizienz wird für jedes Primerpaar mit einer Serie von zehnfach-Verdünnungen der cDNA ermittelt. Die PCR-Effizienz sollte zwischen 80 und 110% liegen und der Korrelationskoeffizient möglichst nah an 1,000 (Vgl. **Abb. 19**).

Zur Berechnung der Quantifizierung der Probe werden die *Cycle Threshold* (CT)-Werte benötigt. Der CT-Wert besagt die Zykluszahl, bei der die Amplifikationskurve nach Abzug des Hintergrundes einen bestimmten Grenzwert überschreitet. Dieser Grenzwert wird in der loglinearen Phase der Amplifikationskurve gesetzt. Zur Auswertung müssen die CT-Werte zunächst mit der PCR-Effizienz verrechnet werden. Anschließend werden die relativen Expressionslevel mit Hilfe der GenEx-Software (Multid Analyses AB Copyright©, limited version) berechnet.

Mit den CT-Werten kann eine auch Überprüfung der verwendeten Referenzgene erfolgen, bei der die Stabilität der Reaktionen mit GeNorm (GenEx-Software) (Vandesompele et al., 2002) berechnet wird. Dabei werden die log₂-transformierten Werte der Expressionslevel von jeder Kombination zweier Referenzgene für jede Probe berechnet.

Eine weitere Analyse kann mit Normfinder (GenEx-Software) durchgeführt werden. Dieses Programm kann nicht nur die Unterschiede im Expressionslevel zwischen den Referenzgenen berechnen, sondern auch zwischen den einzelnen Proben einer Gruppe (Andersen et al., 2004).

Im Rahmen der GenEx-Software-Analyse wurde der Kolmogorow-Smirnov-Test (nach Andrej Nikolajewitsch Kolmogorow und Nikolaj Wassiljewitsch Smirnov) durchgeführt. Dies ist ein statistischer Test der auf der Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen beruht und mit dem man an Hand von Zufallsstichproben prüfen kann, ob zwei Variablen die gleiche Verteilung besitzen oder eine Variable der hypothetischen Wahrscheinlichkeitsverteilung folgt.

5. Ergebnisse

5.1 Infertile Patienten zeigen häufiger eine gestörte Chromatinkondensation als fertile Spender

Um zu überprüfen, inwieweit bei den Ejakulatproben dieser Arbeit eine normale oder gestörte Chromatinkondensation vorlag, wurde ein Anilinblau-Test durchgeführt. Die Chromatinkondensation gilt als gestört, wenn 25 oder mehr Prozent der Spermatozoen einen Status von 2+ und 3+ aufweisen (Henkel et al., 1994). Die Klassifikation ist in den Methoden beschrieben (s. 4.2, S. 63).

Die Ergebnisse sind in **Tabelle 9** zusammengefasst. Werte für jeden Spender und Patienten sind in den Tabellen 4 (S. 50) und 5 (S. 51) in den Materialien abzulesen.

In der Tabelle 9 ist zu erkennen, dass bei den fertilen Männern das Verhältnis von normaler zu gestörter Chromatinkondensation in etwa zwei Drittel zu einem Drittel beträgt. Bei infertilen Männern ist das Verhältnis genau umgekehrt.

Tab. 9: Übersicht über die Ergebnisse des Anilinblau-Testes bei Spendern und Patienten.

Anilinblau-Test 2+ & 3+	Spender (fertil)				Patienten (infertil)			
	<25%	≥25%	Nicht bestimmt	Gesamt	<25%	≥25%	Nicht bestimmt	Gesamt
Anzahl	5	3	0	8	23	45	5	73
In Prozent (%)	62,5	37,5	0	100	31,5	61,6	6,9	100

5.2 Das H3K9ac-Protein in Spermien

5.2.1 Der H3K9ac-Antikörper ist spezifisch

Mittels Western Blot-Technik wurde die Spezifität des H3K9ac-Antikörpers und das Vorhandensein des H3K9ac-Proteins im Proteinextrakt von humanen Spermatozoen nachgewiesen. Ein Antikörper gegen unspezifische Immunglobuline (IgG) wurden dabei als Kontrolle verwendet.

Die Western Blot-Analyse detektierte eine Bande von 17kDa, welches der vorhergesagten relativen Molekülmasse von H3K9ac entspricht (**Abb. 20**).

Eine weitere schwache Bande eines unbekannt Proteins wurde bei einer Masse von 19kDa gefunden. Die IgG-Kontrolle erwies sich als negativ.

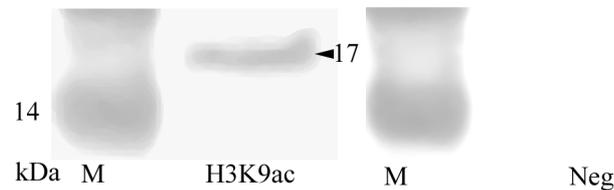


Abb. 20: Western Blot-Analyse des polyklonalen ab4441-Antikörpers gegen H3K9ac im Proteinextrakt von humanen Spermatozoen. Ein Antikörper gegen IgG wurde dabei als Negativ-Kontrolle verwendet. Der H3K9ac-Antikörper detektierte eine Bande von 17kDa, was dem relativen Molekulgewicht von H3K9ac entspricht. M = Marker (seeBlue^R Plus Pre-Stained Massen-Standard; Invitrogen).

5.2.2 Das H3K9ac-Protein ist in der Spermatogenese und in Spermien exprimiert

Um das Vorhandensein des H3K9ac-Proteins in der Spermatogenese und in Spermien zu untersuchen, wurde Immunhistochemie an Hodenbiopsien mit normaler (n = 7) und defekter (n = 10) Spermatogenese (s. Tab. 6, S. 54) und an Spermien aus Ejakulat von fertilen (n = 5) und infertilen Männern (n = 3) (s. Tab. 4, S.50 und 5, S. 51) durchgeführt. Bei den infertilen Männern wurden gezielt Ejakulate mit Spermien ausgewählt, die eine hohe Anzahl an Kopfdefekten (>90%) aufwiesen, da H3K9ac als Kernprotein im Nukleus lokalisiert ist. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Immunhistochemie ohne den primären Antikörper durchgeführt.

In Hodenbiopsien mit qualitativ und quantitativ normaler Spermatogenese zeigten sich positive Signale von H3K9ac in Spermatogonien Typ A und Typ B, präleptotänen, leptotänen, zygotänen und frühen pachytänen (Stadium I-III) Spermatozyten und in runden/elongierten Spermatischen der Stadien III bis IV (die Stufen 3 bis 4) des menschlichen Keimzellzykluses (**Abb. 21a, A-D**).

In Hodenbiopsien mit defekter Spermatogenese, die eine sogenannte „bunte Atrophie“ (Vgl. Einleitung, 2.1.6, S. 23) aufwiesen, wurden ebenfalls positive Signale von H3K9ac in Spermatogonien Typ A und Typ B, präleptotänen, leptotänen, zygotänen, frühen pachytänen (Stadium I-III) Spermatozyten und in runden/elongierten Spermatischen der Stadien III bis IV in den Tubuli mit qualitativ intakter Spermatogenese detektiert. Somit war das Expressionsmuster identisch mit dem in Tubuli mit qualitativ und quantitativ normaler Spermatogenese.

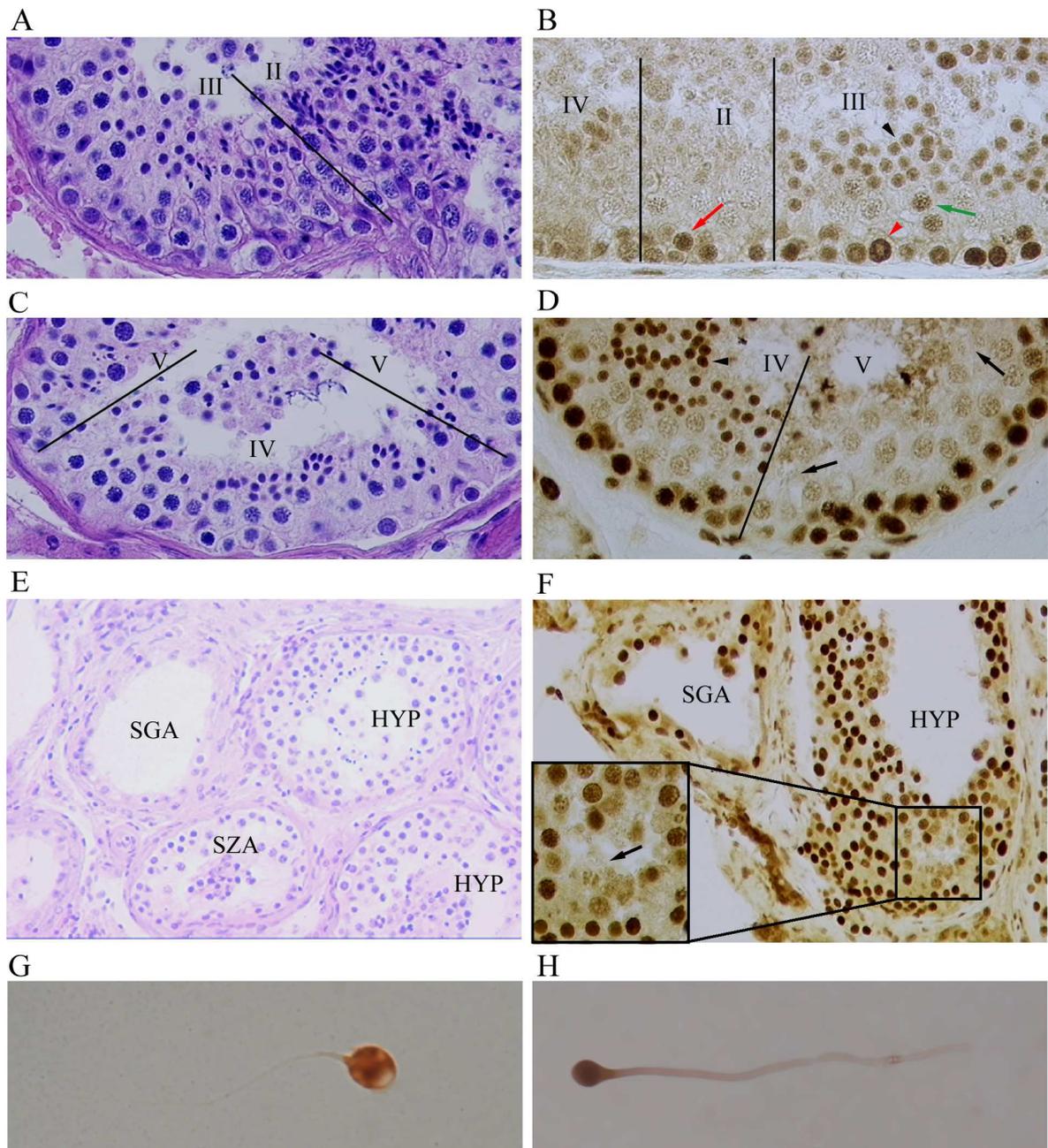


Abb. 21a: Immunhistochemie von H3K9ac in normaler (A-D) und defekter (E, F) Spermatogenese und in Spermien von fertilen (G) und infertilen (H) Männern. H3K9ac wies in Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese (A-D) eine positive Immunreaktion in Spermatogonien Typ A_{dark} (roter Pfeilkopf, B) und B (roter Pfeil, B) auf, sowie in primären Spermatozyten (grüner Pfeil, B) bis zum frühen pachytänen Stadium. Zusätzlich konnte ein Signal in Spermatiden der Stadien III (schwarzer Pfeilkopf, B) und IV (schwarzer Pfeilkopf, D) detektiert werden. (A und C zeigen Hämatoxylin-Eosin-Färbungen derselben Stadien). Des Weiteren zeigten Hodenschnitte mit einer „bunten Atrophie“ das gleiche Expressionsmuster von H3K9ac wie in Hodenproben mit intakter Spermatogenese (F; E: Hämatoxylin-Eosin-Färbung) (HYP = Hypospermatogenese in Kombination mit Spermatidenreifungsarrest, SGA = Spermatogonienreifungsarrest, SZA = Spermatozytenreifungsarrest; schwarze Pfeile: elongierte Spermatiden).

H3K9ac zeigte ebenfalls positive Signale in ejakulierten Spermatozoen von fertilen Männern (G) und Spermatozoen, die Kopfdefekte aufwiesen (H). Alle Spermien zeigten nach der Immunhistochemie eine abnormale Kopfform auf Grund der Verwendung des *Decondensing Mixes*.

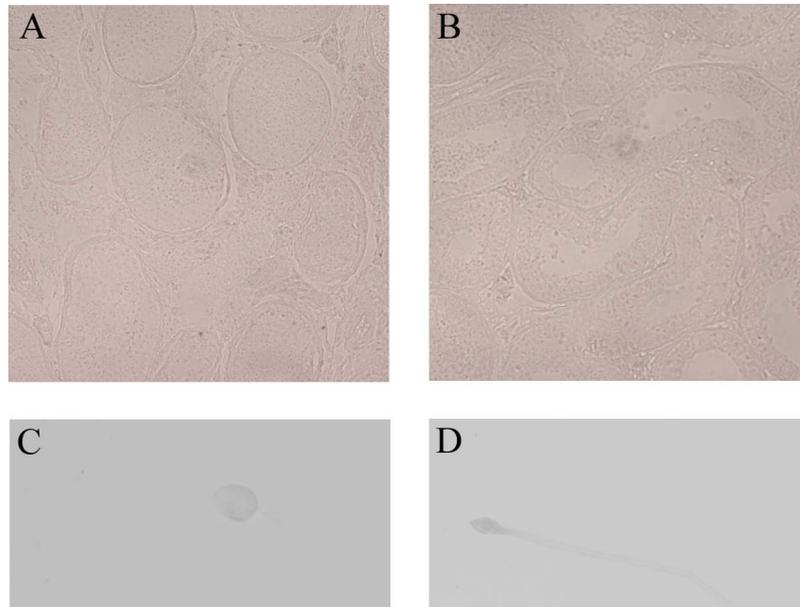


Abb. 21b: Negativkontrollen der Immunhistochemie. Die Negativ-Kontrollen von normaler (A) und defekter (B) Spermatogenese sowie von Spermien fertiler Männer (C) und Spermien mit Kopfdefekten (D) von infertilen Männern wiesen keine Färbung auf. Alle Spermien zeigten nach der Immunhistochemie eine abnormale Kopfform auf Grund der Verwendung des *Decondensing Mixes*. A, B = Phasenkontrastaufnahmen; C, D = Hellfeldaufnahmen

In den Tubuli mit Hypospermatogenese, welche eine geringe Anzahl an elongierten Spermatiden aufweisen, oder in Tubuli mit Spermatogonien-, Spermatozyten-, oder Spermatidenreifungsarresten war das Muster ebenfalls übereinstimmend, wenn man berücksichtigt, dass die letzten Keimzellstadien fehlen (**Abb. 21a; E, F**).

Die Negativ-Kontrollen dagegen wiesen keinerlei Hintergrundfärbung auf (**Abb. 21b; A, B**).

In Spermien von fertilen Männern (Anteil streng klassifizierter normaler Spermien $\geq 15\%$) konnte eine positive Immunreaktion von H3K9ac detektiert werden (**Abb. 21a; G**). Zusätzlich wurden positive Signale für H3K9ac in Spermatozoen von infertilen Männern, die eine Vielzahl von Kopfdefekten aufwiesen (Anteil streng klassifizierter normaler Spermien $< 10\%$), gefunden (**Abb. 21a; H**). Die Negativ-Kontrollen zeigten auch in diesem Versuch keinerlei Anfärbung (**Abb. 21b; C, D**).

5.2.3 H3K9ac ist mit unterschiedlichen Genregionen assoziiert

Zur Untersuchung inwieweit H3K9ac mit verschiedenen Genen bzw. Genregionen assoziiert ist, wurde Chromatin Immunpräzipitation mit Chromatin aus ejakulierten humanen Spermatozoen und dem im vorherigen Kapitel beschriebenen ab4441-H3K9ac-Antikörper durchgeführt. Als Referenz wurde ein 10% Input von der sonifizierten Chromatin-Probe zurück behalten. Des Weiteren wurden bei allen ChIP-Experimenten unmodifiziertes Histon H3 als Positiv-Kontrolle (da H3 Bestandteil von Nukleosomen ist) und IgG als Negativ-Kontrolle für die PCRs mitlaufen gelassen.

Nach den ChIP-Experimenten wurden die H3K9ac-DNA-Probe und die Input-DNA-Probe amplifiziert und reamplifiziert, um ausreichende Mengen von DNA für ein Microarray zu erhalten. Anschließend wurden mit drei verschiedenen Proben (zwei fertile Spender und ein *Pool* infertiler Patienten, s. Material, Tab. 4, S. 50 und 5, S. 51) ENCODE-Microarrays (ChIP-on-chip) durchgeführt. Nach einer Analyse der Daten wurden spezielle Gene für die Validierung mittels ChIP und semiquantitativer PCR, sowie real time PCR ausgewählt.

Zunächst wurden vier Gene des in dieser Arbeit verwendeten Arrays ausgewählt, die eine Anreicherung von H3K9ac im Promotorbereich zeigten: *INHA*, *IL3*, *FAM50A* und *STK11IP*. Zusätzlich wurde *GAPDH* als klassisches Referenzgen verwendet (Barber et al., 2005; Sha et al., 2002). Drei weitere Gene (*SOX2*, *EVX1* und *KLF4*) wurden auf Grund von ENCODE-Microarray-Daten ausgewählt, die eine Anreicherung von trimethyliertem Histon 3 an Lysin 4 (H3K4tm) in ihren Promotorregionen in menschlichen Spermien zeigten (Hammoud et al., 2009).

Zusätzlich wurden acht Genbereiche auf dem Array ausgewählt, die eine FDR (*False Discovery Rate*) von $\leq 0,05$ (hochsignifikant) oder $\leq 0,1$ (signifikant) aufwiesen.

Für diese Bereiche, die im Promotor und der kodierenden Region von den Genen *CRAT*, *CTSD*, *FLNA*, *G6PD*, *MCF2L*, *PLXNA3* und *SH3GLB2* und in der intergenischen Region nahe des Gens *TH* lagen, wurden ebenfalls Primer generiert (s. Tab. 2, S. 45).

Des Weiteren wurden HeLa-Zellen und Zellen aus Prostata-Gewebe (*Benign Prostate Hyperplasia* = BPH) als Kontrollen verwendet. In vorherigen Untersuchungen konnte bereits eine Anreicherung des H3K9ac im *H19*-Promotor und in der *GAPDH*-kodierenden Region in BPH-Chromatin nachgewiesen werden (Paradowska et al., 2009).

5.2.3.1 Das H3K9ac-Verteilungsmuster in Spermien unterscheidet sich von dem in HeLa-Zellen

Semiquantitative PCRs wurden mit einer Input-Verdünnungsreihe von 10%-0,1% durchgeführt. Für die oben genannten ersten acht Gene wurden Primerpaare in der Promotorregion (Transkriptionsstart und bis zu 2kb *upstream*) und in Kontrollregionen *upstream* vom Promotor (intergenisch) und *downstream* vom TSS (kodierende Region bzw. intergenisch) generiert (s. Tab. 2, S. 45).

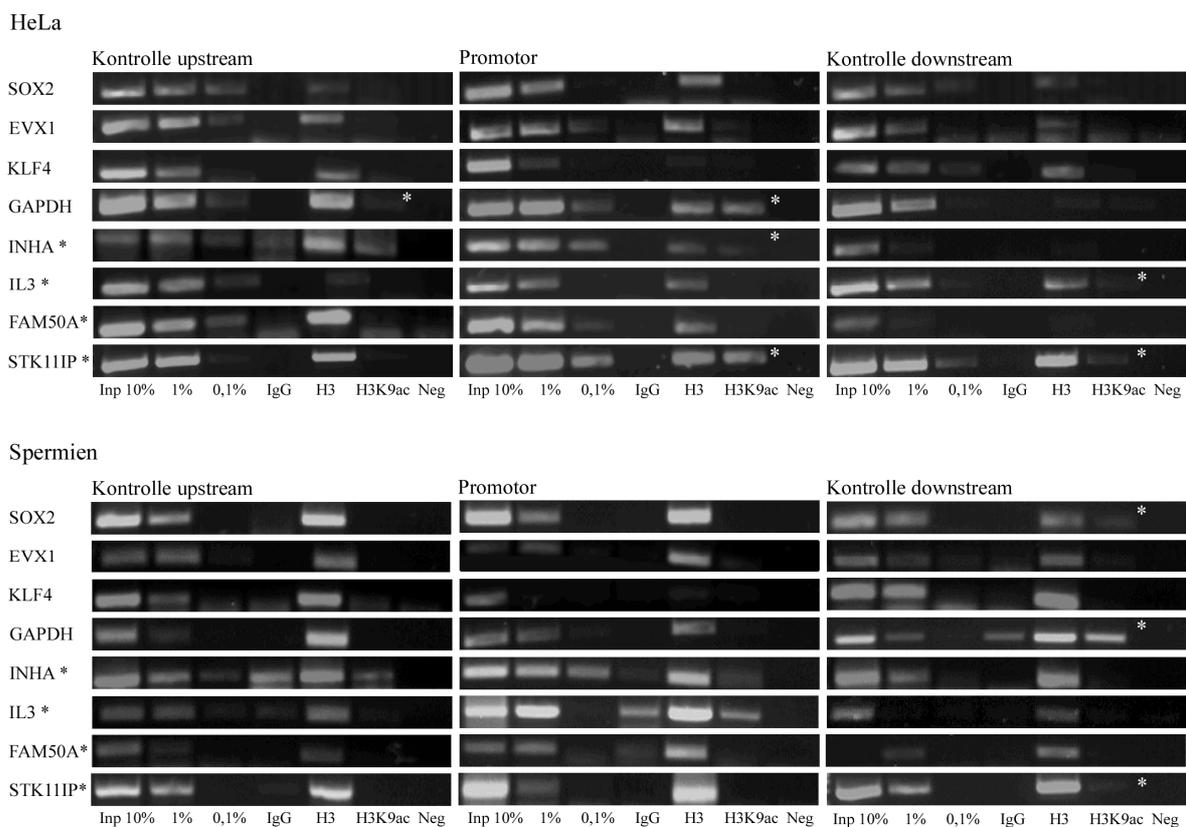


Abb. 22: Individuelle PCR-Produkte von ChIP-Experimenten in Kombination mit semiquantitativer PCR. Es wurde Chromatin von HeLa-Zellen und Spermien verwendet, das mit Antikörpern gegen H3K9ac, H3 (Positiv-Kontrolle) und IgG (Negativ-Kontrolle) immunpräzipitiert wurde. Alle PCRs wurden mit einer Input-Verdünnungsreihe durchgeführt. Die Negativ-Kontrolle (Neg) enthält nur Wasser als *Template*. Acht Primerpaare wurden verwendet, um Bindungsstellen von H3K9ac in den Promotorregionen mit Kontrollen *upstream* (intergenisch) und *downstream* (kodierende Region bzw. intergenisch) zu analysieren. Die vier Gene, die mit einem schwarzen Sternchen markiert sind, wurden auf Grund von ChIP-on-chip Daten von H3K9ac ausgewählt. Ein weißes Sternchen markiert die Anreicherung von H3K9ac. Bei der *downstream*-Kontrolle für das *FAM50A*-Gen konnte nur ein PCR-Produkt beim 1% Input, jedoch nicht beim 10% Input detektiert werden.

Unmodifiziertes Histon 3 wurde an allen Promotor- und Kontrollregionen von allen Genen in HeLa-Zellen und Spermien gefunden, mit Ausnahme vom *KLF4*-Promotor in HeLa-Zellen und den *downstream*-Kontrollen von *GAPDH*, *FAM50A* und *INHA* in HeLa-Zellen. Schwache Anreicherung von H3 wurden an der *IL3-upstream*-Kontrolle in HeLa und dem *KLF4*-Promotor in Spermien gefunden (**Abb. 22**).

Anreicherung von H3K9ac wurde in der *GAPDH-upstream*-Kontrollregion, den Promotorregionen von *GAPDH*, *INHA*, *STK11IP* und den *IL3*-, *STK11IP-downstream*-Kontrollregionen in HeLa-Chromatin detektiert (**Abb. 22, weiße Sternchen**).

In Spermien-Chromatin war H3K9ac in den *downstream*-Kontrollregionen von *SOX2*, *GAPDH* und *STK11IP* lokalisiert (**Abb. 22, weiße Sternchen**). Weitere Banden von H3K9ac wurden auf Grund von unspezifischer Anreicherung in der IgG-Kontrolle nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass sich das Verteilungsmuster von H3K9ac im Genom von HeLa-Zellen und Spermien, abgesehen von der *STK11IP-downstream*-Kontrolle, nicht überlappt.

5.2.3.2 Das H3K9ac-Verteilungsmuster in Spermien von fertilen Männern unterscheidet sich von dem in infertilen Männern

Semiquantitative PCRs wurden mit ChIP-DNA aus HeLa- und Prostata-Zellen, sowie Spermien von fertilen und infertilen Männern und den in 5.2.3 beschriebenen acht Primern, die hochsignifikante oder signifikante Anreicherungsregionen von H3K9ac amplifizieren, durchgeführt (Primer, s. Tab. 2, S. 45).

H3 war, abgesehen von der *TH*-Region in Prostata-Gewebe, in allen Genregionen und Zelltypen angereichert.

H3K9ac wurde in allen Regionen in Spermien von fertilen Spendern detektiert. Im Gegensatz dazu konnte H3K9ac in HeLa-Zellen nur in den Regionen von *CRAT*, *FLNA* und *G6PD* und in Prostata-Gewebe nur in den Regionen von *CRAT*, *CTSD*, *FLNA*, *G6PD*, *MCF2L*, *SH3GLB2* und *TH* gefunden werden (**Abb. 23A-C**).

In Spermien-DNA von infertilen Patienten konnte eine H3-Anreicherung in allen Regionen, eine H3K9ac-Anreicherung jedoch nur in den Regionen von *CRAT*, *G6PD* und *SH3GLB2* nachgewiesen werden (**Abb. 23D**). Das H3K9ac-Verteilungsmuster stimmt somit in fertilen und infertilen Männern nicht überein.

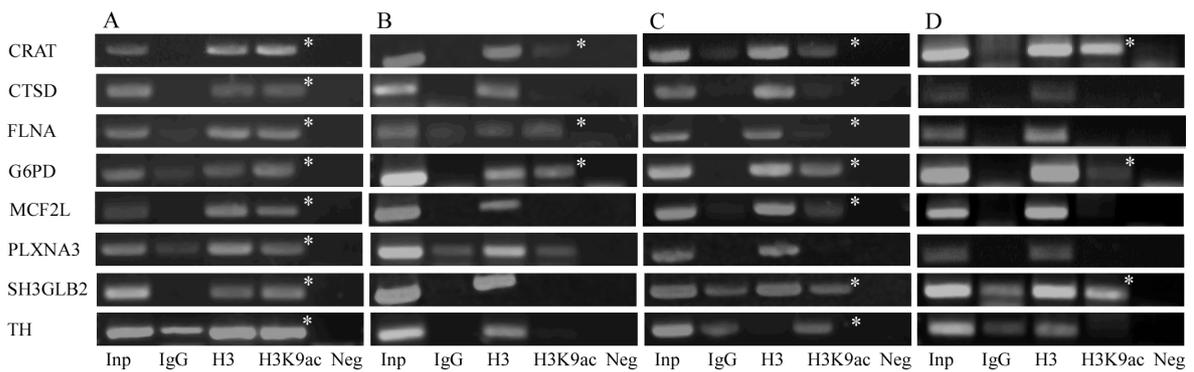


Abb. 23: Individuelle PCR-Produkte von ChIP-Experimenten in Kombination mit semiquantitativer PCR. Es wurde Chromatin von HeLa-Zellen (B), Prostata-Gewebe (BPH) (C) und Spermien von fertilen (A) und infertilen Männern (D) verwendet, das mit Antikörpern gegen H3K9ac, H3 (Positiv-Kontrolle) und IgG (Negativ-Kontrolle) immunpräzipitiert wurde. Die Negativ-Kontrolle (Neg) enthält nur Wasser als *Template*. Acht Primerpaare wurden ausgewählt, um Bindungsstellen in verschiedenen Regionen von Genen zu analysieren, die in ChIP-on-chip-Experimenten hochsignifikante oder signifikante Anreicherung von H3K9ac zeigten. Ein weißes Sternchen steht für eine H3K9ac-Anreicherung.

5.2.3.3 Das Anreicherungsmuster von H3K9ac gegenüber H3 ist nicht konserviert in verschiedenen Genen

Die real time PCR wurde mit denselben Genregionen wie im vorherigen Versuch (*CRAT*, *CTSD*, *FLNA*, *G6PD*, *MCF2L*, *PLXNA3*, *SH3GLB2* und *TH*) durchgeführt und ChIP-DNA aus normalen Spermien als *Template* benutzt, um zu überprüfen, ob Anreicherung von H3K9ac relativ zum Input oder im Verhältnis zu H3 in verschiedenen Genen unterschiedlich ist.

Die Positiv-Kontrolle H3 zeigte eine Anreicherung zwischen 2,9 und 44,7% relativ zum Input, während die Negativ-Kontrolle nur eine Anreicherung zwischen 0,1 und 2,2% aufwies. H3K9ac war relativ zum Input zwischen 9,7 (*FLNA*) und 32,8% (*G6PD*) angereichert (**Abb. 24**).

Das Ergebnis zeigt, dass das Verhältnis von H3K9ac zu H3 bei jedem Gen unterschiedlich ist. Bei den Genregionen von *PLXNA*, *G6PD* und *CRAT* ist H3 stärker angereichert als H3K9ac. Bei den übrigen Genregionen ist es umgekehrt.

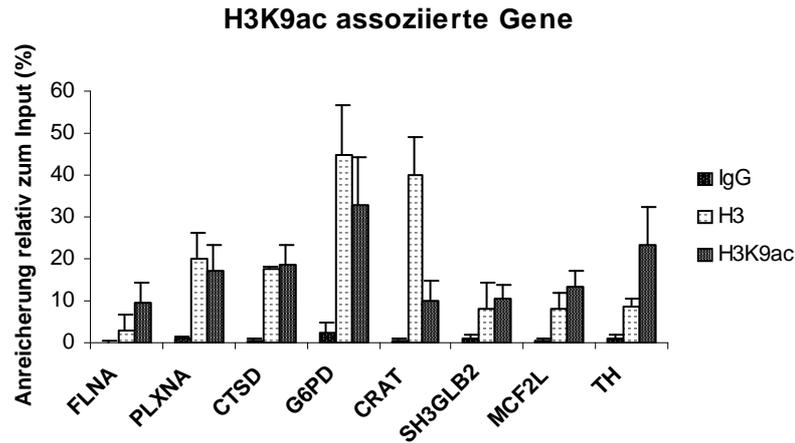


Abb. 24: Das Anreicherungsmuster von H3K9ac an ausgewählten Genen in Spermien von fertilen Männern. H3 wurde als Positiv- und IgG als Negativ-Kontrolle benutzt. H3K9ac zeigte relativ zum Input bzw. im Verhältnis zu H3 ein unterschiedliches Anreicherungsmuster in den verschiedenen Genregionen.

5.2.3.4 Die mit H3K9ac assoziierten Gene haben unterschiedliche Funktionen

In den vorherigen Experimenten zeigte sich, dass H3K9ac in Spermien mit elf Genen assoziiert ist: *SOX2*, *GAPDH*, *STK11IP*, *CRAT*, *CTSD*, *FLNA*, *G6PD*, *MCF2L*, *PLXNA3*, *SH3GLB2* und *TH*. Es stellte sich daher die Frage, ob diese Gene überlappende Funktionen zeigen.

Unter Benutzung des *Gene Ontology* (GO)-Systems wurden die Gene bezüglich ihrer molekularen Funktion, der Involvierung in einen biologischen Prozess oder das Vorhandensein des dazugehörigen Proteins an einem bestimmten zellulären Ort klassifiziert. Die GO-Annotationen der ausgewählten Gene werden auf dem *University of California Santa Cruz* (UCSC) *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) veröffentlicht.

Folgende überlappende Funktionen wurden für die Gene gefunden:

SOX2, *GAPDH*, *STK11IP*, *FLNA* und *SH3GLB2* (Proteinbindung); *GAPDH* und *G6PD* (katalytische Aktivität) und *GAPDH*, *G6PD* und *TH* (Oxidoreduktase-Aktivität).

Zudem sind die Gene in folgende biologische Prozesse involviert:

GAPDH, *G6PD* und *TH* (metabolische Prozesse); *SOX2* und *FLNA* (Transkription oder transkriptionale Regulation); *SOX2* und *TH* (biosynthetische Prozesse); *FLNA* und *PLXNA3* (Signal-Transduktion); *FLNA* und *PLXNA3* (Entwicklung der Nerven / des Gehirns und des Nervensystems).

Tab. 10: Die Funktionen der mit H3K9ac assoziierten Gene und die Lokalisation der dazugehörigen Proteine. Die Gene wurden mit dem *Gene Ontology* (GO)-System klassifiziert. Lücken repräsentieren eine unbekannte Funktion oder Lokalisation.

Genname	Molekulare Funktion	Biologischer Prozess	zelluläre Lokalisation
<i>SOX2</i> (Sex-determinierende Region Y-Box 2)	-DNA-Bindung -Transkriptionsfaktor – Aktivität -Protein-Bindung	-Festlegung des Zellschicksals -Chromatin-Architektur -Transkription -Regulation der Transkription -Morphogenese des Innenohrs -Pigment Biosynthese -Detektion mechanischer Stimuli	-Nukleus -Zytoplasma
<i>GAPDH</i> (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)	-katalytische Aktivität -phosphorylierende Aktivität -Oxidoreduktase-Aktivität -Protein-Bindung -NAD-Bindung	-Glukose-Metabolismus -Glykolyse -Metabolische Prozesse	-Zytoplasma -Membran
<i>STK11IP</i> (LKB1 interagierendes Protein)	-Protein-Bindung -Kinase-Aktivität	-	-
<i>CRAT</i> (Carnitin-Acetyltransferase Isoform 1, Vorstufe)	-Acetyltransferase-Aktivität -Transferase-Aktivität	-	-
<i>CTSD</i> (Cathepsin D Preproprotein)	-aspartische Endopeptidase-Aktivität -Cathepsin D-Aktivität -Pepsin A-Aktivität -Peptidase-Aktivität -Hydrolase-Aktivität	-Proteolyse	-extrazelluläre Region -Mitochondrium -Lysosom -Melanosom
<i>FLNA</i> (Filamin A, alpha Isoform 2)	-Aktin-Bindung -Signal-Umwandler-Aktivität -Protein-Bindung -Transkriptionsfaktor-Bindung -Aktinfilament-Bindung	-Zell-Motilität -Signal-Transduktion -Entwicklung des Nervensystems -Organisation des Aktin-Zytoskelettes -Regulation des Transkriptionsfaktoren-Imports -Regulation der NF-kappa B-Kaskade -Regulation der Transkriptionsfaktoren-Aktivität	-Nukleus -Zytoplasma -Zytoskelett -Aktin-Zytoskelett

<i>G6PD</i> (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Isoform a)	-katalytische Aktivität -Bindung -Oxidoreduktase-Aktivität	-Carbohydrat-Metabolismus -Glukose-Metabolismus -metabolische Prozesse	-
<i>MCF2L</i> (MCF 2. Zelllinie, abgeleitete Umwandlung)	-	-	-
<i>PLXNA3</i> (Plexin A3)	-Rezeptor-Aktivität -Transmembran-Rezeptor-Aktivität	-Signal-Transduktion -Entwicklung des vielzelligen Organismus -Axon-Leitung -Entwicklung des Hippocampus -Entwicklung von pyramidalen Neuronen -Regulation des Axon-Ausbaus -Chemotaxis	-Intrazelluläre Membranbestandteil
<i>SH3GLB2</i> (SH3-Domäne GRB2 -wie Endophilin B2)	-Protein-Bindung	-	-Zytoplasma
<i>TH</i> (Tyrosin Hydroxylase Isoform c)	-Monoxygenase-Aktivität -Eisenion-Bindung -Oxidoreduktase-Aktivität -Metallion-Bindung	-Catecholamin-Metabolismus/ biosynthetischer Prozess -Synaptische Übersetzung -Aminosäure-Metabolismus -Anatomische Struktur -Morphogenese -Neurotransmitter-Metabolismus/ biosynthetischer Prozess	-

Lokalisiert sind die Proteine der untersuchten Gene hauptsächlich im Zytoplasma (*SOX2*, *GAPDH*, *FLNA* und *SH3GLB2*), im Nukleus (*SOX2* und *FLNA*) oder in Membranen (*GAPDH* und *PLXNA3*). Die kompletten Daten sind in **Tabelle 10** dargestellt.

Die mit H3K9ac assoziierten Gene zeigen teilweise überlappende Funktionen, aber insgesamt ist H3K9ac mit Genen assoziiert, die eine Vielzahl verschiedener Funktionen zeigen.

5.3 Analysen zum *BRDT*-Gen in Spermien

5.3.1 Epigenetische Markierungen des *BRDT*-Gens in Spermien

5.3.1.1 Das *BRDT*-Gen ist im Spermien-Chromatin von fertilen Männern mit modifizierten Histonen assoziiert

Die Assoziation des *BRDT*-Gens mit modifizierten Histonen wurde mittels ChIP und real time PCR analysiert. Für den Versuch wurden Antikörper gegen die modifizierten Histone acetyliertes Histon 3 an Lysin 9 (H3K9ac), dimethyliertes Histon 3 an Lysin 9 (H3K9dm), trimethyliertes Histon 3 an Lysin 9 (H3K9tm) und trimethyliertes Histon 3 an Lysin 27 (H3K27tm) (Vgl. Einleitung, Abb. 8, S. 35) und Spermien-Chromatin von fertilen Männern verwendet.

Drei Primerpaare wurden für die Promotorregion (Pr 1-3) und eines für das erste Exon (Ex) des *BRDT*-Gens generiert (s. Tab. 3, S. 49 und Abb. 10, S. 49). PCR-Produkte jedes Primerpaares wurden sequenziert (Scientific Research and Development GmbH, Oberursel) mit dem Ergebnis, dass nur die gewünschten Produkte amplifiziert wurden.

In der vorliegenden Studie wurde acetyliertes Histon 4 nicht berücksichtigt, da die Daten eines früheren Promotor-Arrays (ChIP-on-chip) zeigten, dass acetyliertes Histon 4 an Lysin 12 (H4K12ac) sowohl in Spermatozoen von fertilen (Arpanahi et al., 2009), als auch von infertilen Männern (Daten unveröffentlicht) nicht mit dem *BRDT*-Gen assoziiert ist.

Unmodifiziertes H3 wurde wie in den vorherigen Versuchen als Positiv-Kontrolle verwendet. H3 zeigte die geringste Anreicherung in der Promotorregion 1 (10%) und die höchste für das erste Exon (35%). Ebenso wurde IgG erneut als Negativ-Kontrolle verwendet. Es zeigte geringe Anreicherungen unspezifischer Bindungen in allen Genregionen (**Abb. 25 und 26**).

H3K9ac wies eine relative Anreicherung zum Input in allen *BRDT*-Regionen auf, mit der geringsten Anreicherung in der Promotorregion 1 (2%) und der höchsten in der Promotorregion 2 (9%) (**Abb. 25 und 26**). Die methylierten Histone H3K9dm, H3K9tm und H3K27tm demonstrierten eine relative Anreicherung zum Input zwischen 2-21% (2-10%, 7-21%, 2-9%) mit den niedrigsten Werten im Exon (**Abb. 25 und 26**).

Dieses Ergebnis zeigt, dass der Promotor und das erste Exon des *BRDT*-Gens im Ejakulat von fertilen Männern mit unterschiedlich modifizierten Histonen assoziiert ist.

5.3.1.2 Die Anreicherung von modifizierten Histonen am *BRDT*-Gen ist in Spermien-Chromatin von infertilen Männern tendenziell reduziert

Der im vorherigen Kapitel beschriebene Versuch wurde mit dem Spermien-Chromatin von infertilen Männern wiederholt, um zu überprüfen, ob sich das Verteilungs- oder Anreicherungsmuster der modifizierten Histone im *BRDT*-Gen zwischen fertilen und infertilen Männern unterscheidet. Da ein ChIP-Versuch mit 6×10^7 Spermien begonnen wird, wurden bei infertilen Patienten die Ejakulate von fünf oder sechs Männern *gepoolt* (s. Tab. 5, S. 51).

Die Negativ-Kontrolle IgG besaß eine Anreicherung von 0-1%, was zeigte, dass unspezifische Bindungen im Ejakulat von infertilen Männern noch geringer waren (**Abb. 25 und 26**).

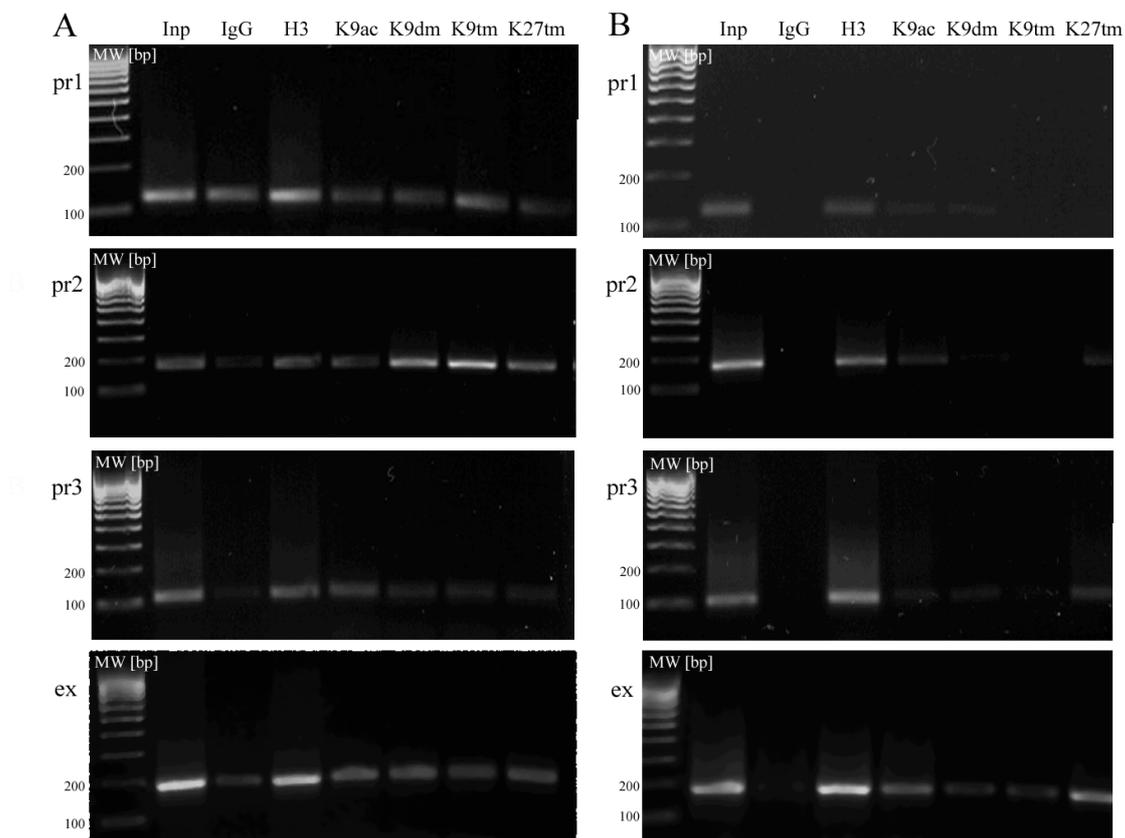


Abb. 25: Individuelle PCR-Produkte aus ChIP-Experimenten in Kombination mit real time PCR. Es wurde Chromatin von Spermien von fertilen (A) und infertilen (B) Männern verwendet, das mit Antikörpern gegen H3K9ac, H3K9dm, H3K9tm, H3K27tm, H3 (Positiv-Kontrolle) und IgG (Negativ-Kontrolle) immunpräzipitiert wurde.

Vier Primerpaare wurden generiert, um die Bindungsstellen im Promotor und im ersten Exon zu analysieren. Reihe 1 repräsentiert einen 1.000bp Größenstandard (Bio-Rad).

Die Positiv-Kontrolle H3 wies eine Anreicherung relativ zum Input auf, die tendenziell größer war als in Spermien von fertilen Männern (9-98%) (**Abb. 25 und 26**).

Interessanterweise zeigte H3K9ac eine geringe Anreicherung in den Promoterregionen (1-4%), im Exon jedoch eine Anreicherung, die viermal höher war als bei fertilen Spendern (**Abb. 25 und 26**).

Die methylierten Histone wiesen insgesamt eine Anreicherung auf, die geringer war als in fertilen Männern (0-5%), mit Ausnahme von H3K27tm (3-24%) (**Abb. 25 und 26**). Im *BRDT*-Exon war die Anreicherung von H3K27tm sogar zwölfmal höher als bei fertilen Männern.

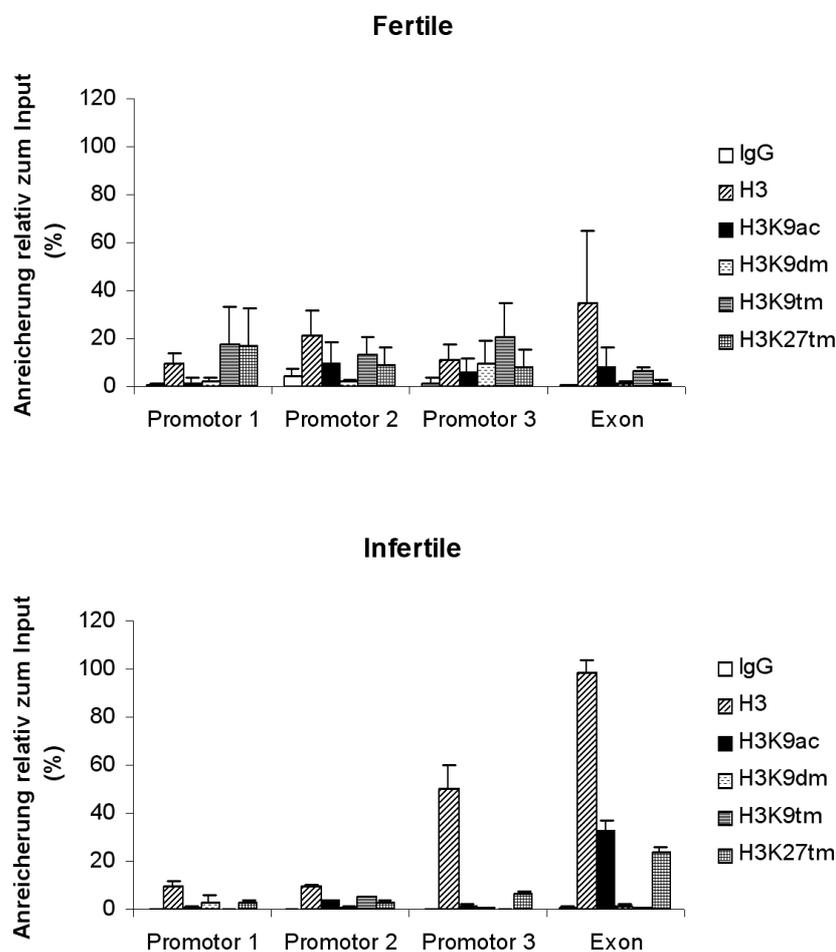


Abb. 26: Das Anreicherungsmuster von H3K9ac, H3K9dm, H3K9tm und H3K27tm in der Promotorregion 1-3 und dem ersten Exon des *BRDT*-Gens in einer Gruppe von fertilen (oben) bzw. infertilen (unten) Männern. Die Anreicherung von modifizierten Histonen ist in infertilen Männern gegenüber fertilen in den meisten Fällen reduziert.

Wenn man die Standardabweichung betrachtet, so ist sie in infertilen Männern niedriger als in fertilen. Ausnahmen sind die von Werte von IgG am Promotor 1, H3 am Promotor 3, H3K9dm am Promotor 1 und H3K27tm am Exon.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Anreicherung von modifizierten Histonen am *BRDT*-Gen in Spermien von infertilen Männern gegenüber fertilen in den meisten Fällen reduziert ist.

5.3.2 Die mRNA-Expression des *BRDT*-Gens in Spermien

5.3.2.1 Die aus humanen Spermien isolierte mRNA war von guter Qualität und frei von Kontaminationen

Um zu überprüfen, ob *BRDT*-mRNA in Spermien von fertilen und infertilen Männern (Details zu den Spendern/Patienten s. Tab. 4, S. 50 und 5, S. 51) vorhanden ist, wurde RNA aus Ejakulat von fertilen und infertilen Männern isoliert. Die RNA-Qualität wurde mit einem Agarose-Gel und mit dem Bioanalyser-Gerät kontrolliert und anschließend in cDNA umgeschrieben.

Die isolierten RNA-Proben von fertilen und infertilen Männern zeigten eine gute Qualität (Beispiel für eine Messung s. **Abb. 27**), da RNA-Fragmente bei einer Größe von 4000 Nukleotiden eine intakte RNA belegen.

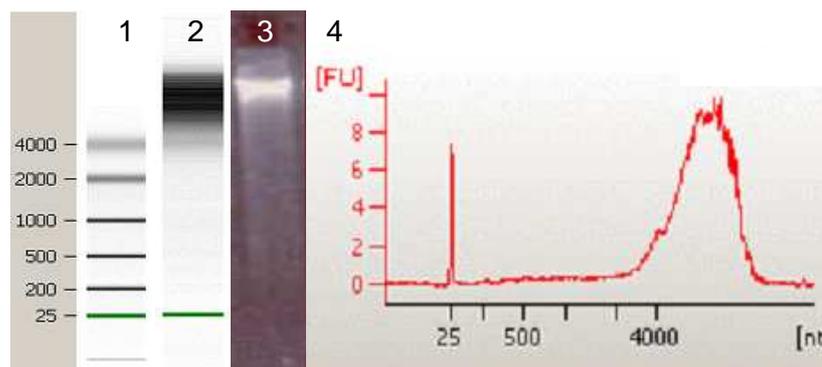


Abb. 27: Qualitätskontrolle von RNA aus Ejakulat mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Agilent 2100 Bioanalyser. Die RNA-Fragmente um 4000 Nukleotide (nt) zeigten eine intakte RNA. Je kleiner die Fragmente sind, desto stärker ist die RNA degradiert. 1: RNA-Marker, Bioanalyser-Aufnahme; 2: mRNA aus Ejakulat, Bioanalyser-Aufnahme; 3: mRNA aus Ejakulat, Agarose-Gel-Bild; 4: mRNA aus Ejakulat, Elektropherogramm, Bioanalyser

Zusätzlich wurden die RNA-Proben auf Kontaminationen mit RNA aus anderen Zellen getestet. Dazu wurde semiquantitative PCR mit den Primer cd45 als Positiv-Marker für Leukozyten und c-kit als Positiv-Marker für testikuläre Keimzellen durchgeführt (Lambard et al., 2004). In unseren Proben wurden keinerlei Verunreinigungen gefunden (**Abb. 28**).

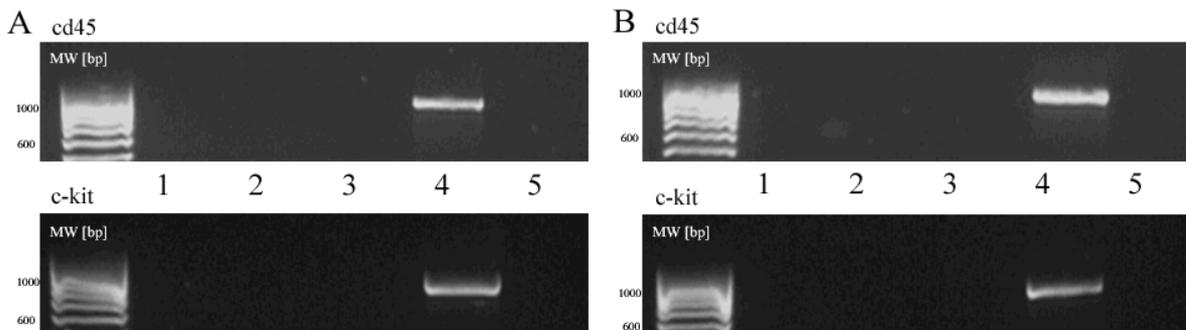


Abb. 28: Überprüfung von Kontaminationen in Spermien-RNA (cDNA) durch die Marker cd45 und c-kit. Die Agarose-Gele zeigten die PCR-Produkte von cd45 und c-kit in fertilen Spendern (A) und infertilen Patienten (B). Die Reihen 1-3 zeigen Proben aus Ejakulaten, die frei von Kontaminationen sind. Die Reihe 4 zeigt Blut-cDNA (bei cd45) bzw. Hoden-cDNA (bei c-kit), die als Positiv-Kontrollen ein PCR-Produkt aufweisen. Die Reihe 5 zeigt die Negativ-Kontrolle, wobei Wasser als *Template* in die PCR eingesetzt wurde.

5.3.2.2 *ACTB* und *GAPD* waren die besten Referenzgene in RT-PCR-Experimenten in Spermien

Quantitative real time RT-PCR wurde mit den cDNA-Proben aus Spermien-RNA und dem Primer für das erste Exon des *BRDT*-Gens durchgeführt. In den PCR-Experimenten wurden die *Housekeeping*-Gene *Heat Shock Protein (HSP)*, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)*, *Beta-Actin (ACTB)* (s. Abb. 19, S. 97) und *ATP-Synthase Subunit 5B (ATP5b)* verwendet (Cavalcanti et al., 2010; im Druck).

Alle PCR-Experimente wiesen nur spezifische Produkte auf, wie man anhand der Schmelzkurven ablesen konnte. Die PCR-Effizienz lag in allen Fällen zwischen 95-99% und der lineare Korrelationskoeffizient (R^2) rangierte zwischen 0,998 und 1,000.

Mit der Normfinder-GeNorm-GenEx pro 4.3.7-Software wurden dann die geeigneten Referenzgene ausgesucht. *ACTB* und *GAPDH* wurden von dem Programm als beste Kombination von Referenzgenen ermittelt (*M-Value* = 1,3) (**Abb. 29**). Des Weiteren wurde *GAPDH* als stabilstes Referenzgen mit der geringsten Variabilität (Standardabweichung = 0,6) ermittelt (**Abb. 30**). Für die folgende real time RT-PCR-Datenanalyse von *BRDT* wurden daher *ACTB* und *GAPDH* als Referenzgene verwendet.

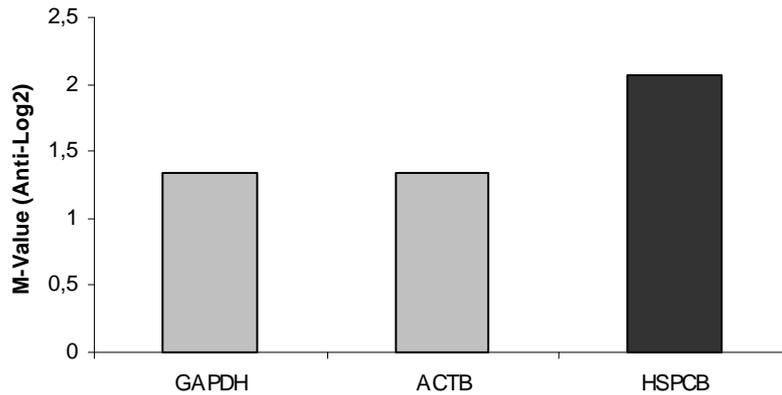


Abb. 29: Analyse der geeignetsten Referenzgene in real time RT-PCR-Experimenten in Spermien. Die GeNorm-Software ermittelte *ACTB* und *GAPDH* als die besten Referenzgene.

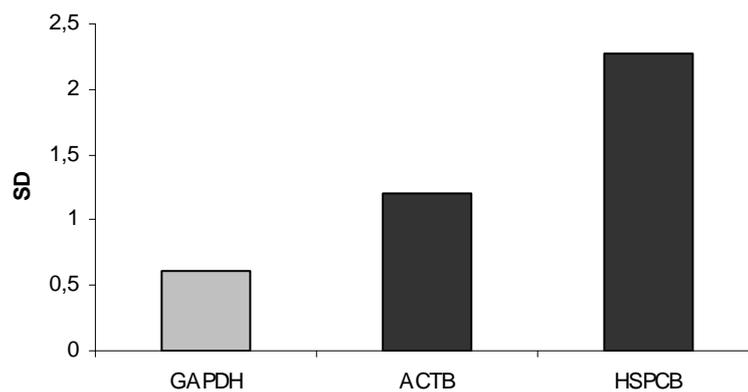


Abb. 30: Analyse der geeignetsten Referenzgene in real time RT-PCR-Experimenten in Spermien. Die Normfinder-Software ermittelte *GAPDH* als das stabilste Referenzgen mit der geringsten Variabilität. SD = Standardabweichung

5.3.2.3 BRDT-mRNA ist in Spermien von fertilen und infertilen Männern exprimiert

BRDT-mRNA konnte in Spermien von fertilen und infertilen Männern mittels real time RT-PCR detektiert werden (**Abb. 31**).

5.3.2.3.1 Die BRDT-mRNA-Expression weicht in fertilen Männern signifikant von der Normalverteilung ab

Bei den BRDT-Transkripten von fertilen Männern konnte eine *Fold-Change*-Spannbreite von 1-7 (Log₂-Skala) ermittelt werden. Dabei zeigte sich eine statistisch signifikante Abweichung von der Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test: *P-Value* = 1,12) (**Abb. 31**).

Im Gegensatz dazu variierten die *Fold-Change*-Werte bei den BRDT-Transkripten von infertilen Männern zwischen 1 und 11. Die Unterschiede zwischen infertilen Männern zeigten keine Abweichung von der Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test: *P-Value* > 0,1) (**Abb. 31**).

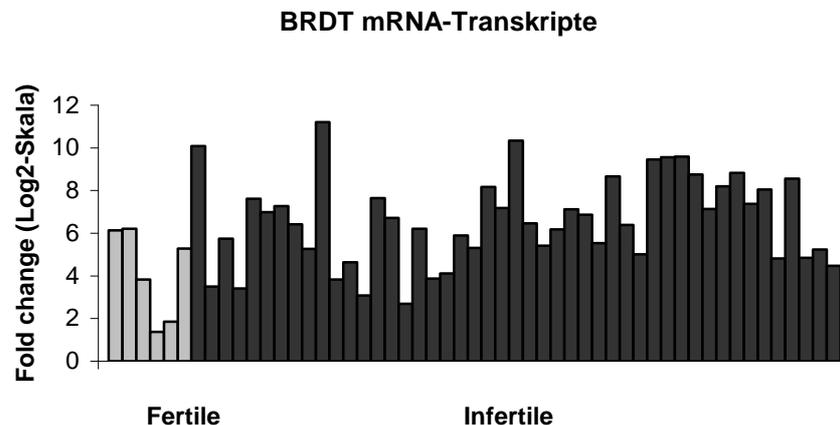


Abb. 31: BRDT-mRNA-Transkripte in Spermien von fertilen (6 Individuen, hellgrau) und infertilen (47 Individuen, dunkelgrau) Männern. *Fold-Change*-Daten sind in der Log₂-Skala dargestellt. Die Werte von fertilen Männern weichen signifikant von einer Normalverteilung ab, während die Werte von infertilen Männern einer Normalverteilung entsprechen (GenEx pro 4.3.7-Software).

5.3.2.3.2 Es besteht ein signifikanter Unterschied in der BRDT-mRNA-Expression zwischen fertilen und infertilen Männern

Für die im vorherigen Kapitel beschriebenen *Fold-Change*-Werte wurden der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall von fertilen gegen infertile Männer (als Gruppen) berechnet (**Abb. 32**).

Das Konfidenzintervall wird auch als Vertrauensbereich oder Mutungsintervall bezeichnet und sagt bei 95% aus, dass in 95 von 100 Fällen die errechneten Intervallgrenzen den wahren Wert enthalten.

Der *Fold-Change*-Mittelwert bei fertilen Männern betrug 4,12 mit einer Standardabweichung von 2,23 und bei infertilen Männern 6,59 mit einer Standardabweichung von 0,61. Der Unterschied zwischen der Gruppe der fertilen und der Gruppe der infertilen Männern ist statistisch signifikant (*two-tailed T-Test: P-Value* = 0,008) (**Abb. 32**).

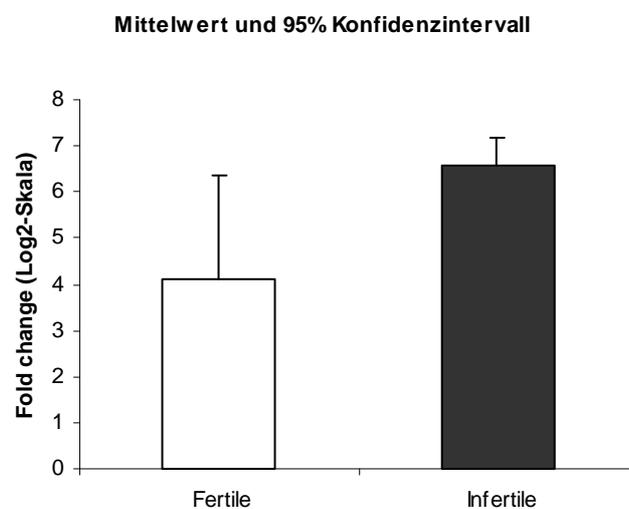


Abb. 32: Mittelwert und 95% Konfidenzintervall von fertilen (n=6) und infertilen (n=47) Männern. *Fold-Change*-Daten sind in der Log2-Skala dargestellt (GenEx pro 4.3.7-Software).

6. Diskussion

6.1 Eine gestörte Chromatinkondensation konnte häufiger bei infertilen als bei fertilen Männern nachgewiesen werden

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass bei infertilen Männern verglichen mit fertilen vermehrt eine Störung der Chromatinkondensation auftritt. Dabei kehrte sich das Verhältnis von normaler zu gestörter Kondensation bei fertilen Spendern (62,5% zu 37,5%) im Vergleich zu infertilen Patienten (31,5% zu 61,6%) um. Zahlreiche Studien wie Colleu et al. (1988), Le Lannou und Blanchard (1988), Auger et al. (1990) und Hofmann und Hilscher (1991) konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der Kernreife bzw. Chromatindefekten und männlicher Infertilität feststellen. Bezüglich der Reife des Kerns zeigten Le Lannou und Blanchard (1988), dass bei fertilen Männern im Durchschnitt $46,3 \pm 4,9\%$ der Spermatozoen und bei infertilen Männern $69,2 \pm 6,7\%$ der Spermatozoen beim Anilinblau-Test gefärbt waren. Auger et al. (1990) fanden in fertilen Männern einen Anteil von $25,5 \pm 2,6\%$ und in infertilen Männern einen Anteil von $47,0 \pm 1,1\%$ gefärbter Spermatozoen. Diese Daten sind mit denen aus der vorliegenden Arbeit nicht vergleichbar, da hier nur die Spermatozoen mit einem Färbegrad von 2+ und 3+ berücksichtigt wurden, während Le Lannou und Blanchard (1988) und Auger et al. (1990) vermutlich auch den Färbegrad 1+ mitzählten. Jedoch kann man aus allen Studien ablesen, dass die Anzahl gefärbter Spermatozoen bei fertilen Männern deutlich unter der von infertilen Männern liegt, wenn auch die Werte deutlich voneinander abweichen.

Auf Grund dieser Kenntnisse wurde bereits 1990 empfohlen, Analysen zur Reife des Spermienkopfes mit in die Routine-Samenanalyse einzubeziehen (Auger et al., 1990), was heute auch üblich ist. Zusätzlich haben Hofmann und Hilscher (1991) herausgefunden, dass auch in morphologisch normalen Spermien Störungen der Chromatinkondensation auftreten. Zudem besitzen auch fertile Männer Spermien mit morphologischen Defekten (Hofmann und Hilscher, 1991). Die Erkenntnisse passen zu dem Ergebnis dieser Arbeit, dass auch fertile Männer zu einem Drittel Spermien mit gestörter Chromatin-Kondensation aufweisen.

6.2 Potentielle Funktionen von H3K9ac in Spermien von fertilen und infertilen Männern

6.2.1 Der H3K9ac-Antikörper ist spezifisch

Die Western Blot-Analyse detektierte eine deutliche Bande von 17kDa, die das H3K9ac-Protein repräsentiert. Des Weiteren wurde eine schwache Bande eines unbekanntes Proteins gefunden, die möglicherweise auf einer Kreuzreaktion mit H3K4ac beruht, die bereits von Wang und Kollegen (2008) beobachtet wurde. Neben dieser Kreuzreaktion von Histon H3-Modifikationen wurden auch noch Kreuzreaktionen zwischen Histon H4-Modifikationen (H4K5ac und H4K12ac; Wang et al., 2008) gefunden, sowie zwischen hyperacetyliertem Histon H4 und Histon H3 (Sonnack et al., 2002).

6.2.2 Die H3K9ac-Protein-Expression zeigt keinen Unterschied zwischen der Spermatogenese und Spermien von fertilen und infertilen Männern

In dieser Arbeit wurde die Rolle des H3K9ac in menschlichen Keimzellen untersucht. Dabei wurde das Expressionsmuster des H3K9ac-Proteins in normaler und fehlerhafter Spermatogenese und im Ejakulat von fertilen und infertilen Männern analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das H3K9ac-Protein während der normalen und fehlerhaften Spermatogenese in Spermatogonien Typ A und B, präleptotänen, leptotänen, zygotänen und frühen pachytänen (Stadium I-III) Spermatozyten und in runden/elongierten Spermatiden (Stadium III-IV) exprimiert wird.

Von Spermatogonien konnte bereits durch immunhistochemische Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen die Proliferationsmarker PCNA und Ki-67 gezeigt werden (Steger et al., 1998b), dass sie mitotisch aktive Zellen sind. Daher kann man bei H3K9ac-Expression in Spermatogonien annehmen, dass H3K9ac eine Rolle in der mitotischen DNA-Synthese spielt. Zusätzlich lässt sich vermuten, dass H3K9ac auf Grund der Expression in primären Spermatozyten in meiotische Teilungen involviert ist, was auch mit Daten von Delaval et al. (2007) übereinstimmen würde, die die H3K9ac-Protein-Expression in der murinen Spermatogenese untersucht haben. Ihre Western-Blot-Analysen in Mäusen demonstrierten, dass das H3K9ac-Protein in Spermatozyten, sowie in runden und elongierten Spermatiden exprimiert ist.

Dabei ist die Expression in Spermatozyten am stärksten und nimmt bis zum Stadium der elongierten Spermatisden immer weiter ab (Delaval et al., 2007). Dieses Ergebnis stimmt mit unserem überein, da wir ein Signal des H3K9ac-Proteins bis zum Stadium der elongierten Spermatisden des Stadiums IV nachweisen konnten, in denen der Histon-Protamin-Austausch stattfindet.

Zusätzlich konnte die Expression des H3K9ac-Proteins in reifen Spermien von fertilen und infertilen Männern nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass H3K9ac vom Stadium der elongierten Spermatisden bis hin zu dem Stadium der reifen Spermien als epigenetische Markierung im Chromatin vorhanden ist. Die Tatsache, dass keine Signale von H3K9ac in Spermatisden der Stufen 5-8 gefunden wurden, beruht wahrscheinlich auf einer Antigen-Maskierung durch hochkondensiertes Chromatin. Da der Kern des reifen Spermiums zu 85% aus dicht gepackten Protamin-DNA-Komplexen besteht, verhindert dies möglicherweise die Bindung des Antikörpers an die Histone. Bei ejakulierten Spermien wurde daher ein spezieller *Decondensing Mix* benutzt, damit der Protamin-DNA-Kontakt gelockert wurde und der Antikörper an das Chromatin binden konnte (Vgl. Hecht et al., 2009). Bei den Hodenschnitten war dies jedoch nicht möglich, da der *Decondensing Mix* das Gewebe zerstört.

Frühere Studien zeigten ein ähnliches Expressionsmuster für hyperacetyliertes H4 (H4hac) (Sonnack et al., 2002), sowie acetyliertes H4 an Lysin 5 (H4K5ac), Lysin 8 (H4K8ac), Lysin 12 (H4K12ac) und Lysin 16 (H4K16ac) (Hecht et al., 2009) während der normalen Spermatogenese beim Menschen. H4hac wird in Spermatogonien, päleptotänen Spermatozyten und runden Spermatisden der Stadien III und IV exprimiert, H4K5ac und H4K12ac in Spermatisden der Stadien III-V, H4K8ac in Spermatogonien und Spermatisden der Stadien III-V und H4K16ac in pachytänen Spermatozyten (Stadium III), runden Spermatisden der Stadien I-III und elongierten Spermatisden der Stadien IV-V (Sonnack et al., 2002; Hecht et al., 2009). Somit scheinen alle Histonmodifikationen, einschließlich des hier untersuchten H3K9ac, in den Histon-Protamin-Austausch während des Stadiums III-IV involviert zu sein.

In dieser Untersuchung wurde für die H3K9ac-Protein-Expression kein Unterschied zwischen (qualitativ und quantitativ) normaler und defekter Spermatogenese gefunden. Im Gegensatz dazu haben Sonnack et al. (2002) für H4hac eine reduzierte Protein-Expression in Spermatisden bei fehlerhafter oder qualitativ normaler Spermatogenese beobachtet.

Des Weiteren wurde für H4ac ein zusätzliches Signal in pachytänen Spermatozyten detektiert, was als Ursache für einen verfrühten Histon-Protamin-Austausch und eine daraus resultierende männliche Infertilität diskutiert wurde. Auch Hecht et al. (2009) konnten Unterschiede in der Expression der Histonmodifikationen bei Tubuli mit rundem Spermatidenarrest nachweisen. So zeigte H4K5ac im Gegensatz zu Tubuli mit normaler Spermatogenese eine reduzierte Expression in Spermatogonien. Bei H4K8ac und H4K12ac fehlte die Expression in Spermatiden und bei H4K16ac die in pachytänen Spermatozyten. Auf Grund dieser Beobachtungen ist es erstaunlich, dass H3K9ac als einzige Histonmodifikation eine konstante Expression zwischen normaler und defekter Spermatogenese aufweist.

6.2.3 H3K9ac ist mit unterschiedlichen Genregionen in Spermien von fertilen und infertilen Männern assoziiert

In einer weiteren Untersuchung wurde die Assoziation von H3K9ac mit verschiedenen Genen in Spermien von fertilen und infertilen Männern, sowie in HeLa- und Prostata (BPH)- Zellen gezeigt.

In den PCR-Experimenten wurde für die *downstream*-Kontrolle eines Gen (*FAM50A*) nur der 1%, nicht aber der 10% Input detektiert. Möglicherweise war die DNA-Konzentration des 10% Inputs zu hoch. Zusätzlich wurde für manche Genregionen die Positiv-Kontrolle H3 nicht nachgewiesen. Aber es ist denkbar, dass bestimmte Regionen nicht mit H3, sondern mit anderen Histonen oder Protaminen assoziiert sind (Simpson und Bustin, 1976; Carter, 1978; Simon et al., 1978; Tanphaichitr et al., 1978; Gatewood et al., 1987). Simpson und Bustin (1976) konnten für HeLa-Zellen zeigen, dass Nukleosomen zu gleichen Anteilen aus den vier Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4 bestehen. In Folge beschrieben Carter (1978) und Simon et al. (1978) DNA-Bindedomänen und DNA-Bindebedingungen für H3 und H4. Für menschliche Spermatozoen demonstrierten Tanphaichitr et al. (1978), dass die Spermien-DNA mit den vier Kernhistonen und den Protaminen 1 und 2 assoziiert ist. Des Weiteren konnten Gatewood et al. (1987) den ersten Nachweis erbringen, dass die Histone und Protamine in Spermien sequenzspezifisch an die DNA gebunden sind.

Trotz der anderen Chromatinproteine kann man die H3-Positiv-Kontrolle als geeignet ansehen, da immer nur 146bp DNA um ein Nukleosom gebunden ist und somit viele H3-DNA-Assoziationen auf engstem Raum auftreten müssten.

Für Spermien, die nur 15% Histone besitzen, konnte diese Studie zeigen, dass H3 eine geeignete Kontrolle ist, da es in Spermien nicht mehr fehlende H3-Bindungsstellen gab als in HeLa- oder Prostata-Zellen.

Anreicherung von H3K9ac wurde in den Promotorregionen von Genen in HeLa-Zellen (*GAPDH*, *INHA*, *STK11IP*, *CRAT* und *G6PD*), normalen Spermien und Prostata-Zellen (*CRAT*, *G6PD* und *MCF2L*), sowie Spermien von infertilen Männern (*CRAT* und *G6PD*) beobachtet. Diese Daten stimmen mit den Untersuchungen von Wang et al. (2008) überein, die gezeigt haben, dass H3K9ac in humanen T-Zellen mit einer Gesamtzahl von 3.286 Genen assoziiert ist und an 25% der menschlichen Promotoren von hoch-exprimierten Genen zu finden ist, die in die zelluläre Physiologie, den Metabolismus und in *House-keeping*-Funktionen involviert sind. Zusätzlich wurden von Hebbes et al. (1988, 1994), Agalioti et al. (2002), Liang et al. (2004), Kurdistani et al. (2004), Bernstein et al. (2005), Liu et al. (2005), Nishida et al. (2006), Heintzman et al., (2007) und Guenther et al. (2007) H3K9ac-Assoziationen (teilweise in Kombination mit H3K14ac, H3K18ac und H3K27ac) mit den Promotoren von aktiven Genen in der Hefe, im Huhn und diversen menschlichen Zelltypen (u. a. humane embryonale Stammzellen, Karzinomzellen der Leber) beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Unterschiede in der H3K9ac-Anreicherung zwischen HeLa-Zellen, Prostata-Gewebe und Spermien könnten daher in der unterschiedlichen Genaktivität in den verschiedenen Zelltypen liegen.

Interessanterweise ist die Nukleosomendichte in H3K9ac assoziierten Promotoren niedriger als in Promotoren ohne H3K9ac (Nishida et al., 2006). Generell korreliert der Grad an H3K9-Acetylierung mit dem Grad an Expression des betroffenen Genes, was jedoch nicht immer zutrifft (Nishida et al., 2006).

In intergenischen Regionen wurden Bindungsstellen für H3K9ac in der Nähe des *GAPDH*-Gens in HeLa-Zellen und des *TH*-Gens in Spermien von fertilen Spendern und in Prostata-Gewebe gefunden. Diese Beobachtung stimmt mit Daten von Roh und Kollegen (2005, 2006) überein, die herausgefunden haben, dass die Hälfte (46,4%) der 50.000 H3-Acetylierungen in humanen T-Zellen intergenisch sind, während die Promotoren einen Anteil von 23,5% und die kodierenden Bereiche einen Anteil von 30% einnehmen. Zudem konnten Roh et al., (2005) nachweisen, dass die intergenischen acetylierten Bereiche häufig mit regulatorischen Elementen oder DNase-sensitiven Bereichen kolokalisieren, was bedeuten könnte, dass H3K9ac Einfluss auf diese Elemente hat.

Auch Bernstein et al. (2005) konnten in humanen Leberkarzinomzellen nachweisen, dass H3K9ac nur zu 58% am Genstart (definiert als 1kb um den Transkriptionsstart) lokalisiert ist und die übrigen H3K9ac-Proteine mit anderen Stellen des Genoms assoziiert sein müssen.

Im Gegensatz dazu konnte für geklonte Mäusen demonstriert werden, dass H3K9ac in intergenischen Regionen weniger konserviert ist als in Promotorregionen von Proteinkodierenden Genen (Nishida et al., 2008). Zudem ist der Anteil der H3K9ac assoziierten Promotoren mit 31% in Mäusen etwas höher als im Menschen (Suzuki et al., 2008).

Des Weiteren wurde eine Assoziation von H3K9ac mit der kodierenden Region von Genen in HeLa-Zellen (*STK11IP*, *IL3* und *FLNA*), normalen Spermien (*SOX2*, *GAPDH*, *STK11IP*, *FLNA*, *PLXNA3*, *SH3GLB2* und *CTSD*), Prostata-Gewebe (*CTSD*, *FLNA* und *SH3GLB2*) und in Spermien von infertilen Männern (*SH3GLB2*) beobachtet. Diese Ergebnisse passen zu den Daten von Nahkuri et al. (2009), die zeigten, dass Nukleosomen bevorzugt in Exonregionen in humanen T-Zellen und Spermien (und in Blastulae vom japanischen Reiskörpfling) lokalisiert sind, unabhängig von dem Modifikationsstatus des Nukleosoms, des Expressionslevels oder der evolutionären Konservierung der Gene und dem GC-Gehalt des Exons. Auch Roh et al., (2004) konnten für die Hefe nachweisen, dass die höchsten Acetylierungsraten von H3 und H4 in der kodierenden Region und nicht im Promotor lokalisiert sind. Es ist jedoch nicht bekannt, ob Nukleosomen im Allgemeinen zufällig in der kodierenden Region von Genen positioniert werden, oder ob es eine gewisse Periodik gibt (Baldi et al., 1996; Kogan und Trifonov, 2005; Jiang und Pugh, 2009).

Für methylierte Histone (H3K9dm und H3K9tm) konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass der kodierende Bereich von manchen Genen (z. B. *Hbb-b1* und *GATA2* in der Maus) höhere Anreicherungen der Histonmodifikationen enthält als der Promotorbereich (Wu et al., 2007).

Des Weiteren scheint die Position von Histonmodifikationen in Zusammenhang mit Gen-Silencing durch DNA-Methylierung zu stehen. In einer murinen Leukämie-Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass zwischen H3K9ac und DNA-Methylierung eine reverse Korrelation besteht (Wu et al., 2007), was bedeutet, dass H3K9ac eine hohe Anreicherung an den unmethylierten CpG-Inseln zeigt und eine niedrige an den hypermethylierten. Die untersuchten Genombereiche in dieser Arbeit wurden nicht bezüglich DNA-Methylierung untersucht. Dies wäre jedoch ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen in Spermien, da Hammoud et al. (2009) bereits zeigen konnten, dass die DNA von Promotoren entwicklungsrelevanter Gene hypomethyliert ist.

Insgesamt zeigten die Daten der vorliegenden Arbeit, dass sich das Expressionsmuster des H3K9ac-Proteins weder zwischen normaler und fehlerhafter Spermatogenese noch zwischen ejakulierten Spermatozoen von fertilen und infertilen Männern unterscheidet. Dagegen lässt sich auf molekularer Ebene ein Unterschied im Bindungsmuster des H3K9ac-Proteins zu ausgewählten Genen zwischen ejakulierten Spermien von fertilen und infertilen Männern feststellen. Dieser Befund liegt möglicherweise darin begründet, dass der Unterschied zwar auf molekularer Ebene detektierbar ist, jedoch nicht mittels Immunhistochemie.

6.2.4 Die mit H3K9ac assoziierten Gene haben zum Teil Funktionen in der Embryonalentwicklung

In der Hefe und in humanen T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass sich die gängigsten Kombinationen von Histonmodifikationen, sowohl an aktiven, als auch an inaktiven Promotoren, bestimmten Gengruppen zuordnen lassen, die in den gleichen zellulären Prozess (nach der *Gene Ontology*-Klassifikation) involviert sind (Liu et al., 2005; Wang et al., 2008). Daher wurden die in dieser Arbeit verwendeten Gene ebenfalls auf einen solchen Zusammenhang hin untersucht, was jedoch, abgesehen von einer Funktion in der Proteinbindung, wenig Übereinstimmungen zeigte.

Für manche der mit H3K9ac assoziierten Gene sind jedoch relevante Funktionen für die Embryonalentwicklung bekannt, z. B. für *G6PD* (Sarkar et al., 1977; Morton et al., 2007; Perl, 2007; Merighe et al., 2009); *SOX2* (Shi et al., 2006) und *PLXNA3* (Cheng et al., 2001; Waimey et al., 2008). *G6PD* ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und zeigt daher eine Sex-determinierte Expression in Spermien, da Spermien entweder ein X- oder ein Y-Chromosom enthalten (Sarkar et al., 1977). Die vollständige Defizienz von *G6PD* ist lethal (Perl, 2007). Da *G6PD* essentiell für die Entwicklung ist, ist es erstaunlich, dass es zwischen männlichen und weiblichen Embryonen einen Unterschied in der *G6PD*-Expression gibt (Morton et al., 2007). Während der Entwicklung wird in weiblichen Embryonen ein X-Chromosom inaktiviert, welches dann zu einer Dosierung des Gentranskripts führt. Obwohl das zu gleichen Transkriptmengen in beiden Geschlechtern führen sollte, wurden in weiblichen Embryonen geringere Transkriptmengen gefunden als in männlichen (Merighe et al., 2009).

SOX2 gilt als Markergen und ist essentiell für die Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen. Es kann auch in spermatogonialen Stammzellen als Marker verwendet werden, was belegt, dass spermatogoniale und embryonale Stammzellen ähnlichen Mechanismen unterliegen (Shi et al., 2006).

PLXNA3 ist das am meisten exprimierte Gen der Plexin-Familie in Regionen des sich entwickelnden Säugetier-Nervensystems (Cheng et al., 2001). Waimey und Kollegen (2008) konnten nachweisen, dass Plexin A3 und Plexin A4 essentiell für die normale Entwicklung des sympathischen Nervensystems sind.

Die Beobachtung, dass H3K9ac mit entwicklungsrelevanten Genen in Spermien assoziiert ist, stimmt mit den Ergebnissen von Hammoud et al. (2009) überein, die beschrieben, dass Entwicklungsgene in Spermien generell mit Nukleosomen angereichert sind. Zu den entwicklungsrelevanten Genen gehören die *imprinted Gen-Cluster*, *microRNA-Cluster*, *HOX-Gen-Cluster* und die Promotoren von entwicklungsrelevanten Transkriptionsfaktoren und Signalproteinen. Auch Studien von Banerjee und Smallwood (1998), Onyango et al. (2002) und Delaval et al. (2007) zeigten die Assoziation von modifizierten Histonen mit den paternalen *imprinted-Clustern IGF2* und *KvDMR1* in männlichen Keimzellen. Die Histon-Assoziation schützt die *imprinted-Cluster* möglicherweise vor frühzeitiger DNA-Methylierung.

Außerdem wird angenommen, dass Histone die Globin-Gene in humanen Spermien für eine frühe Expression im Embryo markieren, da ϵ - und γ -Globin-Gene im embryonalen Dotter transkribiert werden und die Histon-Acetylierung während der Zellteilungen der Zygote erhalten bleibt (Wolffe, 1994; Gardiner-Garden et al., 1998; Forsberg et al., 2000; Bulger et al., 2003; Wykes und Krawetz, 2003). Das postnatal exprimierte *β -Globin-Gen* ist dagegen mit Protaminen assoziiert (Gardiner-Garden et al., 1998).

Im Gegensatz dazu gelten auch die Promotoren der embryonal nicht exprimierten *PRM1-PRM2-TNP2*-Domäne in menschlichen Spermien als bevorzugt mit Histonen angereichert, wie Wykes und Krawetz (2003) zeigten.

Auf Grund dieser Erkenntnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Histone und Protamine nicht zufällig im Spermien-Chromatin positioniert werden (Zalensky et al., 1995; Wykes und Krawetz, 2003). Generell sind ca. 15% des haploiden Genoms in Spermien mit Histonen assoziiert, der Rest ist mit Protaminen verpackt, wobei jedoch gemischte Bereiche auftreten, in denen sowohl Histone als auch Protamine vorhanden sind (Hammoud et al., 2009).

Van der Heijden und Kollegen (2006, 2008) konnten nachweisen, dass Histonvarianten und Histonmodifikationen bei Mäusen und beim Menschen in die Zygote übertragen werden können. H3K9ac könnte somit eine Funktion im frühen Embryo einnehmen. Dies wäre eine Erklärung dafür, warum H3K9ac mit entwicklungsrelevanten Genen assoziiert ist.

6.3 Der Zusammenhang von H3K9ac und dem BRDT-Protein

Obwohl bekannt ist, dass H3K9ac und andere Histonmodifikationen in biologische Prozesse involviert sind, weiß man nur wenig über die genauen Mechanismen, wie diese Modifikationen ihre Signale in eine biologische Reaktion umsetzen. Es ist z. B. bekannt, dass H3K9ac und H3K14ac entscheidend für die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors IID (TFIID) sind und mit der Modifikation H3K4tm und der RNA Polymerase II in Promotoren von Protein-kodierenden Genen kolokalisieren (Agalioti et al, 2002; Guenther et al., 2007).

Diese Erkenntnis stimmt mit der gängigen Hypothese überein, dass die postrationalen Histonmodifikationen die Signale durch sogenannte Effektorproteine (*readers*) übermitteln (Ruthenburg et al., 2007). Die Bindung von *downstream*-Effektorproteinen ändert möglicherweise den Zugang von Transkriptionsfaktoren zur DNA, die Enzymaktivität von ATP-abhängigen Chromatin Remodeling-Komplexen oder die Sekundärstruktur des Chromatins (Ruthenburg et al., 2007; Berger, 2007). Damit die Effektorproteine an die Histonmodifikationen binden können, benötigen sie Bindungsmodule, wie z. B. Bromodomänen für acetylierte Histone und Chromodomänen, Tudor-Domänen, MBT-*repeats*, WD40-*repeats* und PHD-Finger für methylierte Histone (Taverna et al., 2007). Das **BRDT-Protein** ist ein Effektorprotein und besitzt zwei Bromodomänen, die insbesondere an hyperacetyliertes Histon H4 binden (Pivot-Pajot et al., 2003).

6.4 Hypothesen zur BRDT-Expression in Spermien von fertilen und infertilen Männern

6.4.1 Die Reduzierung der epigenetischen Markierungen am *BRDT*-Gen in infertilen Männern führt zu veränderter Expression

In dieser Studie wurde die Interaktion von den modifizierten Histonen H3K9ac, H3K9dm, H3K9tm und H3K27tm mit dem *BRDT*-Gen in fertilen und infertilen Männern untersucht, wobei ChIP-Experimente demonstrierten, dass der Promotor des *BRDT*-Gens mit mehr als nur einer Histonmodifikation interagiert. Diese Beobachtung stimmt mit Daten von Bernstein et al. (2005, 2006, 2007) und Azuara et al. (2006) überein, die überlappende Regionen von zwei verschiedenen modifizierten Histonen als *bivalente Domänen* beschrieben. Als Beispiel konnte die Kombination aus der transkriptional reprimierenden Modifikation H3K27tm und der aktivierenden Modifikation H3K4tm in embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden (Bernstein et al., 2006, Roh et al., 2006). In humanen Spermien wurden 861 *bivalente Domänen* ermittelt (Hammoud et al., 2009).

Identische Bindungsmuster für verschiedene Histone wurden auch von Wang und Kollegen (2008) beobachtet. Sie ermittelten eine Kombination von 17 Modifikationen, darunter H3K9ac, die in aktiven Genen in humanen T-Zellen angereichert sind und in Zellphysiologie und Metabolismus involviert sind. Des Weiteren konnten Wang et al. (2008) für inaktive Gene, die für zelluläre und synaptische Signalwege und für die Entwicklung verantwortlich sind, eine weitere Kombination von Modifikationen nachweisen (u a. mit H3K27tm). Auch Roh et al. (2006) fanden heraus, dass H3K9ac, H3K14ac, H3K4tm und H3K27tm gleichzeitig an den Promotoren von über 3.300 Genen in humanen T-Zellen vorhanden sind.

In diesem Zusammenhang wurde auch die sogenannte Histoncode-Hypothese bekannt, die besagt, dass die überschneidenden Bindungsmuster von modifizierten Histonen an bestimmten Genregionen epigenetische Informationen für die Chromatin-Umstrukturierung sicherstellen können, in dem sie von Effektorproteinen (s. 6.3) abgelesen werden (Wade et al., 1997; Strahl und Allis, 2000; Turner, 2000; Jenuwein und Allis, 2001; Schreiber und Bernstein, 2002). Der Code wird als epigenetisch bezeichnet, da er vererbbar ist (Turner, 2000).

Jedoch gilt zu beachten, dass pluripotente Zellen nur eine von zwei epigenetischen Markierungen behalten, wenn sie sich differenzieren, um entweder die Expression oder Repression eines Genes zu bewirken (Bernstein et al., 2005; Azuara et al., 2006). Welche Modifikation beim *BRDT*-Gen in Spermien oder in der Embryonalentwicklung erhalten bleibt, ist nicht bekannt.

Wie Valls et al. (2005) und Xin et al. (2007) zeigen konnten, gibt es aber Modifikationen, die während der mitotischen Zellteilungen erhalten bleiben. Zum Beispiel di- und trimethyliertes H3K4 und die acetylierten Histone 3 und 4 an den *GAPDH*-, *IL2*- und *HSP70*- Promotoren in HeLa-Zellen (Valls et al., 2005) und methyliertes H3K79, dimethyliertes H3K4 und die acetylierten Histone 3 und 4 am *β -Globin*-Lokus in murinen Leukämie-Zellen (Xin et al., 2007).

Wenn man die Anreicherung von H3K9ac, H3K9dm, H3K9tm und H3K27tm am *BRDT*-Gen in Spermien betrachtet, so konnten nur geringe Unterschiede zwischen fertilen und infertilen Männern beobachtet werden. In infertilen Männern gibt es eine Tendenz der Reduzierung von modifizierten Histonen, da nicht alle Werte von infertilen Patienten im Rahmen der Standardabweichung der Werte von fertilen Spendern liegen.

Da vermehrt methylierte Histone mit dem *BRDT*-Gen assoziiert sind, ist anzunehmen, dass es in den späten Stadien der Spermatogenese reprimiert wird. Die reprimierende Funktion von methylierten Histonen (u. a. H3K9tm) wurde bereits für das *Stromal Membrane-associated GTPase-activating Protein (SMAP)*-Gen in humanen CD4⁺ T-Zellen beschrieben (Wang et al., 2008). Zudem wurde für H3K9tm nachgewiesen, dass es meistens *downstream* von einem Transkriptionsstart oder in transkribierten Bereichen eines Gens lokalisiert ist, was für das *BRDT*-Gen nicht zutrifft. Die Reprimierung eines Gens und die gleichzeitige Kompaktierung des Chromatins wird durch die Interaktion von H3K9tm, sowie von H3K9dm und H3K27tm mit dem Heterochromatin-Protein 1 (*HP1*) und dem PolyComb-Komplex bewirkt (Margueron et al., 2005; Vakoc et al., 2005; McGarvey et al., 2006; Wiencke et al., 2008).

Im Allgemeinen wurde beobachtet, dass Lysin-Acetylierung mit transkriptionaler Aktivität korreliert (Jenuwein und Allis, 2001), während Methylierung sowohl die Expression (z. B. trimethyliertes H3K4; Santos-Rosa et al., 2002), als auch die Repression (z. B. di-/trimethyliertes H3K9, H3K27; Bernstein et al., 2007; Li et al., 2007) von Genen bewirken kann. Jedoch ist die Funktion von modifizierten Histonen in der transkriptionalen Regulation noch nicht abschließend geklärt.

Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein hoher Grad an acetylierten Histonen dafür verantwortlich ist, die Zellen in einem undifferenzierten und pluripotenten Zustand zu belassen, während die reprimierenden Modifikationen H3K9dm und H3K9tm erst während der Entwicklung zunehmen (Lee et al., 2004; Meshorer et al., 2006; Roh et al., 2006). Entwicklungsrelevante Gene müssen jedoch auch in pluripotenten Zellen durch Histonmodifikationen (z. B. H3K27tm in Verbindung mit den Effektorproteinen des PolyComb-Komplexes) reprimiert werden. Dieser Sachverhalt wurde für embryonale Stammzellen nachgewiesen (Lee et al., 2006). Inwieweit er auch auf spermatogoniale Stammzellen zutrifft und somit während der Spermatogenese beobachtbar wäre, ist nicht bekannt. Jedoch konnte in Spermien nachgewiesen werden, dass H3K27tm mit Promotoren von entwicklungsrelevanten Genen assoziiert ist (Hammoud et al., 2009).

Des Weiteren wurde ein Modell vorgeschlagen, dass jede Modifikation das Potential zur Aktivierung oder Reprimierung hat, je nachdem, wo sie lokalisiert ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation von H3K9dm mit dem *BRDT*-Gen beobachtet. Es ist denkbar, dass es eine reprimierende Funktion am Promotor von *BRDT* und eine aktivierende in der Exonregion von *BRDT* einnimmt, angelehnt an die Funktionsvorschläge für diese Modifikation von Vakoc et al. (2005) in Säugetier-Chromatin.

Außerdem konnte in der murinen Leukämie-Zelllinie L1210 festgestellt werden, dass H3K9ac eine größere Anreicherungsspannbreite als H3K9dm in Chip-Experimenten zeigt (Wu et al., 2007). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Jedoch liegen hier nur Daten von vier genomischen Bereichen im *BRDT*-Gen für H3K9ac und H3K9dm vor, die möglicherweise nicht repräsentativ sind.

Des Weiteren ist zu den ChIP-Experimenten anzumerken, dass sich eine hohe Anreicherung von unmodifiziertem H3 in Chromatin von fertilen und infertilen Männern zeigte. Dies ist möglicherweise darauf zurück zu führen, dass es größere Mengen von unmodifiziertem H3 als von modifiziertem gibt. Andere Möglichkeiten sind eine bessere Antikörper-Affinität von H3 als von den anderen Antikörpern oder eine geringe DNA-Input-Präparation, die die Ergebnisse der Berechnungen beeinflusst.

Interessant für die Interpretation der ChIP-Experimente sind auch die Daten von Dobsen et al. (2004), die Gen-Expressions-Profile in menschlichen Embryonen aus der Präimplantationsdiagnostik, sowie primäre und sekundäre Oozyten als Kontrolle untersucht haben.

Zum einen konnte BRDT-Expression in Microarray-Experimenten nachgewiesen werden, zum anderen wurde eine dreifache *Upregulierung* des BRDT-Expressionslevels in primären und sekundären Oozyten im Gegensatz zu Embryonen (Tag 1-2) gefunden, was die Hypothese zulässt, dass das paternale Chromatin zu der BRDT-Expression beiträgt (Dobson et al., 2004, Supplementary Data).

6.4.2 Die BRDT-mRNA-Expression unterscheidet sich zwischen fertilen und infertilen Männern

Zusätzlich wurde in dieser Studie die BRDT-mRNA-Expression in fertilen und infertilen Männern untersucht. BRDT-mRNA konnte sowohl in Spermien von fertilen, als auch in Spermien von infertilen Männern nachgewiesen werden, wobei der Unterschied zwischen fertilen und infertilen Männern signifikant war. Im Gegensatz dazu konnten Wawrzik und Kollegen (2009) keine Unterschiede im BRDT-Expressionslevel zwischen Keimzellen von Männern mit Hypospermatogenese und normaler Spermatogenese finden. Jedoch konnten sie eine Hochregulation der BRDT-Expression, sowie weiterer epigenetischer Chromatin-Remodeling-Faktoren (MBD1, MBD2, MBD3L1, SUVH39H2 und EZH2) während der Spermatogenese (während oder nach der Meiose) nachweisen. Möglicherweise liegt der Unterschied zu den hier vorgestellten Ergebnissen darin begründet, dass Wawrzik et al. (2009) Hodenbiopsien verwendeten, in denen alle Keimzellstadien vorhanden sind, während für diese Arbeit ejakulierte Spermien benutzt wurden.

Dass die Anzahl von BRDT-Transkripten in infertilen Männern höher war als in fertilen, lässt vermuten, dass die Transkripte in infertilen Patienten nicht ausreichend translatiert wurden.

Zusätzlich konnten deutliche Unterschiede zwischen dem BRDT-mRNA-Level von verschiedenen infertilen Patienten ermittelt werden, die auf große individuelle Varianzen schließen lassen. Jedoch lassen sich auch in ejakulierten Spermien von fertilen Männern geringe Unterschiede im Expressionslevel feststellen. Es ist denkbar, dass die Unterschiede in der fehlenden Einheitlichkeit von Ejakulaten begründet sind. Wenn man Ejakulatparameter von fertilen Männern vergleicht, so lassen sich große Differenzen feststellen (WHO, 1999).

Da in Spermien eine bedeutende Menge an BRDT-Transkript vorhanden ist, könnte es sein, dass die Transkripte für weitere Funktionen in der Zygote aufbewahrt werden, wie Miller et al. (2005) vorgeschlagen haben. Da nachgewiesen werden konnte, dass zahlreiche Spermien-mRNAs (z. B. von *HSP70*, *HSP90* und *ACTB*) in die Zygote übertragen werden, wird ihnen eine bedeutende Rolle für die frühe Embryonalentwicklung zugeschrieben (Ostermeier et al., 2002, 2004).

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Spermien-mRNAs und somit die BRDT-mRNA bzw. das BRDT-Protein eine strukturelle Rolle im Chromatin-Remodeling oder *Imprinting* in Spermien einnehmen (Miller et al., 2005).

6.5 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt die vorliegende Arbeit folgende Hypothesen zu: Das Vorhandensein von H3K9ac in männlichen Keimzellen deutet eine wichtige Funktion in der Spermienentwicklung an. Des Weiteren ist H3K9ac mit verschiedenen Genregionen im Spermien genom assoziiert, was auf eine Funktion als epigenetische Markierung schließen lässt, die in den Embryo übertragen wird und somit die Gene beeinflusst, die zuerst nach der Fertilisierung transkribiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die epigenetische H3K9ac-Markierung an bestimmten Genen in infertilen Männern verändert ist.

Zudem zeigen diese Daten, dass *BRDT* eine wichtige Rolle für die Spermienentwicklung, Fertilisierung und eventuell die frühe Embryonalentwicklung spielt, da Spermien bedeutende Mengen an BRDT-mRNA besitzen und der Promotor und die kodierende Region des *BRDT*-Gens mit modifizierten Histonen assoziiert ist, die als epigenetische Markierungen dienen.

7.1 Zusammenfassung

HINTERGRUND: Während der Spermatogenese werden die Histone zu 85% durch Protamine ausgetauscht. Es wird angenommen, dass die verbleibenden Histone essentielle Markierungen für die Ausbildung von epigenetischen Informationen im Nachwuchs tragen. Epigenetische Abnormalitäten können im männlichen Genom zu Fehlern nach der Fertilisierung führen. Das Ziel dieser Studie war, das Expressionsmuster von H3K9ac in der Spermatogenese von fertilen und infertilen Männern zu analysieren und das Bindungsmuster an ausgewählte Gene in Ejakulat zu untersuchen. Zusätzlich sollte die Interaktion des *BRDT*-Gens mit verschiedenen modifizierten Histonen in Spermien analysiert werden, da angenommen wird, dass Histon-Varianten in die Expression oder Repression von Genen nach der Fertilisierung involviert sind. Des Weiteren wurde das mRNA-Expressionslevel von *BRDT* untersucht, um Zusammenhänge zwischen epigenetischen Veränderungen, mRNA-Expression und Infertilität aufzudecken.

METHODEN: Hodenbiopsien mit normaler und fehlerhafter Spermatogenese, sowie Ejakulate von fertilen und infertilen Männern wurden für Immunhistochemie mit einem H3K9ac-Antikörper verwendet. Des Weiteren wurde Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit Spermien-DNA von fertilen und infertilen Männern, sowie HeLa-Zellen und Prostata-Gewebe als Kontrollen durchgeführt, unter Benutzung von Antikörpern gegen spezifisch acetylierte und methylierte Histone H3. Anschließend wurde die Assoziation von *BRDT* und anderen ausgewählten Genen mittels semiquantitativer und real time PCR analysiert. Das *BRDT*-mRNA-Level wurde mit real time Reverse Transkriptase-PCR untersucht.

ERGEBNISSE: Immunhistochemie von H3K9ac zeigte positive Signale in Hodenbiopsien in Spermatogonien A/B, präleptotänen, leptotänen, zygotänen und pachytänen Spermatozyten, runden/elongierten Spermatiden (Stadium III-IV) und reifen Spermien von fertilen und infertilen Männern. H3K9ac war mit Genpromotoren (*CRAT*, *G6PD*, *MCF2L*), Exons (*SOX2*, *GAPDH*, *STK11IP*, *FLNA*, *PLXNA3*, *SH3GLB2*, *CTSD*) und intergenischen Regionen (*TH*) in fertilen Männern assoziiert und wies Unterschiede im Verteilungsmuster in HeLa-Zellen, Prostata-Gewebe und Spermien von infertilen Männern auf. Zusätzlich demonstrierten ChIP-Experimente die Kolokalisierung von acetylierten und methylierten Histonen in den Promotor- und Exonregionen des *BRDT*-Gens in fertilen Männern.

Interessanterweise konnte tendenziell eine reduzierte Bindung der untersuchten Histonmodifikationen in dem *BRDT*-Promotor bei Spermien infertiler Patienten beobachtet werden. Signifikante Unterschiede im mRNA-Expressionslevel von *BRDT* ließen sich zwischen einer Gruppe von fertilen Spendern und einer Gruppe infertiler Patienten nachweisen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN: Das Vorhandensein von H3K9ac in männlichen Keimzellen lässt auf eine wichtige Rolle für die Spermienentwicklung schließen. Des Weiteren ist H3K9ac mit verschiedenen Genregionen im Spermien genom assoziiert, was auf eine Funktion als epigenetische Markierung schließen lässt, die in den Embryo übertragen werden könnte und somit die Gene beeinflussen würde, die zuerst nach der Fertilisierung transkribiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die epigenetische H3K9ac-Markierung an bestimmten Genen in infertilen Männern verändert ist. Zudem zeigen diese Daten, dass *BRDT* eine bedeutende Funktion für die Spermienentwicklung, Fertilisierung und eventuell die frühe Embryonalentwicklung haben könnte, da Spermien bedeutende Mengen an *BRDT*-mRNA besitzen und der Promotor und die kodierende Region des *BRDT*-Gens mit modifizierten Histonen assoziiert ist, die als epigenetische Markierungen dienen könnten.

7.2 Summary

BACKGROUND: During spermatogenesis, histones are replaced by protamines to about 85%. It has been proposed that the remaining histones might carry essential marks for the establishment of epigenetic information in the offspring. Epigenetic abnormalities in the male genome may cause post fertilisation errors. The aim of the study was to analyze the expression pattern of H3K9ac in spermatogenesis of fertile and infertile men and the binding pattern to selected genes in ejaculates. In addition, the interaction between the *BRDT* gene and differentially modified histones in human spermatozoa was analyzed, as histones variants has been suggested to be involved in gene expression or repression after fertilization. The mRNA level of *BRDT* has been studied in order to find correlations between epigenetic changes, mRNA level and infertility.

METHODS: Testicular biopsies with normal and impaired spermatogenesis, as well as ejaculates of fertile and infertile men were used for immunohistochemistry with H3K9ac antibody. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) was performed with sperm DNA of fertile and infertile men and as controls, HeLa cells and prostate tissue using antibodies against specifically acetylated and methylated histones H3. The binding of *BRDT* and other selected genes was evaluated by semiquantitative and real time PCR. The *BRDT* mRNA level was screened by real time reverse transcriptase PCR.

RESULTS: Immunohistochemistry of H3K9ac demonstrated positive signals in testicular biopsies in spermatogonia A/B, preleptotene, leptotene, zygotene and early pachytene (stage I-III) spermatocytes as well as round/elongating spermatids (stage III-IV) and mature sperm of fertile and infertile men. H3K9ac was associated with gene promoters (*CRAT*, *G6PD*, *MCF2L*), exons (*SOX2*, *GAPDH*, *STK11IP*, *FLNA*, *PLXNA3*, *SH3GLB2*, *CTSD*) and intergenic regions (*TH*) in fertile men and exhibited shifts of the distribution pattern in HeLa cells, prostate tissue and sperm of infertile men. In addition, ChIP assay revealed co-localization of acetylated and methylated histones within promoter and exon regions of the *BRDT* gene in fertile men. Interestingly, by trend, reduced binding of the investigated histone modifications was observed in the *BRDT* promoter of infertile patients. Significant differences of the *BRDT* mRNA level have been detected between a group of fertile donors and infertile patients.

CONCLUSIONS: H3K9ac presence in male germ cells indicates an important role during development of sperm. Furthermore, we suggest that H3K9ac is associated with specific regions of the sperm genome, defining an epigenetic code, which could be transmitted to the embryo and might influence which genes are first transcribed after fertilization. In addition, we could demonstrate that the epigenetic code might be disturbed in ejaculated sperm of infertile patients. In addition, data from the present study suggest that *BRDT* has an important function in fertilization and/or early embryo development, as sperm cells contain high levels of BRDT mRNA and both the promoter and coding region of the *BRDT* gene is associated with modified histones representing epigenetic marks.

7. Literaturverzeichnis

- Aitken R. J., Clarkson J. S., Fishel S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 40: 183-197
- Abbott D. W., Laszczak M., Lewis J. D., Su H., Moore S. C., Hills M., Dimitrov S., Ausio J. (2004). Structural characterization of macroH2A containing chromatin. *Biochemistry* 43: 1352-1359
- Agalioti T., Chen G., Thanos D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111(3): 381-392
- Albig W., Bramlage B., Gruber K., Klobeck H. G., Kunz J., Doenecke D. (1995). The human replacement histone H3.3B gene (H3F3B). *Genomics* 30(2): 264-272
- Allegucci C., Thurston A., Lucas E., Young L. (2005). Epigenetics and the germline. *Reproduction* 129:137-149
- Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 51: 786-794
- Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F. (2004). Normalization of real time quantitative reverse transcription PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245-50
- Angelopoulou R., Plastira K., Msaouel, P. (2007). Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 5: 1-15
- Aoki F., Worrad D. M., Schultz R. M. (1997). Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181: 296-307
- Arpanahi A., Brinkworth M., Iles D., Krawetz S. A., Paradowska A., Platts A. E., Saida M., Steger K., Tedder P., Miller D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* 19(8): 1338-1349
- Auger J., Mesbah M., Huber C., Dadoune J. P. (1990). Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 13(6): 452-462
- Aumüller G., Riva A. (1992). Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia* 24: 183-197
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (Hrsg.)(1999). *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 4, Chapter 21, John Wiley and Sons, New York

- Azuara V., Perry P., Sauer S., Spivakov M., Jørgensen H. F., John R. M., Gouti M., Casanova M., Warnes R., Merckenschlager M., Fisher A. G. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8(5): 532-538
- Baarends W. M., Hoogerbrugge T. W., Roest H. P., Ooms M., Vreeburg J., Hoeijmakers J. H. J., Grootegoed J. A. (1999). Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev Biol* 207: 322-333
- Baldi P., Brunak S., Chauvin Y., Krogh A. (1996). Naturally occurring nucleosome positioning signals in human exons and introns. *J Mol Biol* 263: 503-510
- Balhorn R., Gledhill B. L., Wyrobek A. J. (1977). Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry* 16: 4074-4080
- Balhorn R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 93: 298-305
- Balhorn R., Reed S., Tanphaichitr N. (1988). Abberant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 44: 52-55
- Balhorn R. (1989). Mammalian protamines: structure and molecular interactions. In Adolph K. W. (Hrsg.). *Molecular biology of chromosome function*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 366-395
- Balhorn R., Corzett M., Mazrimas J., Watkins B. (1991). Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry* 30: 175-181
- Balhorn R., Cosman M., Thornton K. (1999). Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In: Gagnon C. (Hrsg.). *The male gamete: From basic science to clinical applications*. Cache River Press, Vienna : 55-70
- Balhorn R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 8(9): 227
- Banerjee S., Smallwood A. (1998). Chromatin modification of imprinted H19 gene in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 50(4): 474-484
- Barber R. D., Harmer D. W., Coleman R. A., Clark B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 21: 389-395
- Bedford J. M., Calvin H. I., Cooper G. W. (1973). The maturation of spermatozoa in human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 18: 199-213
- Belokopytova I. A., Kostyleva E. I., Tomilin A. N., Vorob'ev V. I. (1993). Human male fertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 34: 53-57
- Bench G. S., Corzett M. H., DeYebra L., Oliva R., Balhorn R. (1998). Protein and DNA contents in sperm from an infertile human male possessing protamine defects that vary over time. *Mol Reprod Dev* 50: 345-353

- Berger S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447: 407-412
- Bergmann M., Kliesch S. (1998). 1.2. Spermatogenese. In: *Andrologie*, 3. Auflage, Krause W., Weidner W. F. (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart: 9-14
- Bernstein P., Peltz S. W., Ross J. (1989). The poly (A)-poly A binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 9: 659-670
- Bernstein B. E., Kamal M., Lindblad-Tho K., Bekiranov S., Bailey D. K., Huebert D. J., McMahon S., Karlsson E. K., Kulbokas E. J. 3rd, Gingeras T. R., Schreiber S. L., Lander E. S. (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120(2): 169-181
- Bernstein B. E., Mikkelsen T. S., Xie X., Kamal M., Huebert D. J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Werning M., Plath K., Jaenisch R., Wagschal A., Feil R., Schreiber S. L., Lander E. S. (2006). A bivalent chromatin structure marks key development genes in embryonic stem cells. *Cell* 125(2): 233-236
- Bernstein B. E., Meissner A., Lander E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128(4): 669-681
- Bestor T., Laudano A., Mattaliano R., Ingram V. (1998). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxy-terminal domain of the mammalian enzyme is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 203: 971-983
- Biermann K., Steger K. (2007). Epigenetics in male germ cells. *J Androl* 28(4): 466-480
- Blendy J. A., Kaestner K. H., Weinbauer G. F., Nieschlag E., Schütz G. (1996). Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature* 380: 162-165
- Boenisch T. (2006). Färbemethoden -Detektionssysteme. In: Boenisch T. (Hrsg.), *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden*. 3. Auflage, Dako Deutschland GmbH, Hamburg
- Bradbury E. M. (1992). Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* 14: 9-16
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brandeis M., Ariel M., Cedar H. (1993). Dynamics of DNA methylation during development. *Bioessays* 15(11): 709-713
- Braun R. E. (1991). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Gen* 28: 10-12
- Brehm R., Steger K. (2005). Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. In: *Advances in anatomy, embryology and cell biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 181: 2-7

- Bulger M., Schübeler D., Bender M. A., Hamilton J., Farrell C. M., Hardison R. C., Groudine M. (2003). A complex chromatin landscape revealed by patterns of nuclease sensitivity and histone modification within the mouse beta-globin-locus. *Mol Cell Biol* 23(15): 5234-5244
- Burke L. J., Zhang R., Bartkuhn M., Tiwari V. K., Tavoosidana G., Kurukuti S., Weth C., Galjart N., Ohlsson R., Renkawitz R. (2005). CTCF binding and higher order chromatin structure of the H19 locus are maintained in mitotic chromatin. *EMBO J* 24(18): 3291-3300
- Burnette W. N. (1981). Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacryl-amide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203
- Caron N., Veilleux S., Boissonneault G. (2001). Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol Reprod Dev* 58: 437-443
- Carrell D. T., Emery B. R., Peterson C. M. (1998). The correlation of sperm chromatin decondensation following in vitro exposure to heparin and sperm penetration rates. *J Assist Reprod Genet* 15: 560-564
- Carrell D. T., Liu L. (2001). Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 22: 604-610
- Carter C. W. Jr. (1978). Histone packing in the nucleosome core particle of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 75(8): 3649-3653
- Cavalcanti M. C. O., Schuppe H.-C., Bergmann M., Stalf T., Weidner W., Steger K. (2010). Validation of reference genes in human testis and ejaculate. *Andrologia*, in press
- Cedar H. (1988). DNA methylation and gene activity. *Cell* 53(1): 3-4
- Celeste A., Petersen S., Romanienko P. J., Fernandez-Capetillo O., Chen H. T., Sedelnikova O. A., Reina-San-Martin B., Coppola V., Meffre E., Difilippantonio M. J., Redon C., Pilch D. R., Oлару A., Eckhaus M., Camerini-Otero R. D., Tessarollon L., Livak F., Manova K., Bonner W. M., Nussenzweig M. C., Nussenzweig A. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296: 922-927
- Chen H. Y., Sun J. M., Zhang Y., Davie J. R., Meistrich M. L. (1998). Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem* 273: 13165-13169
- Cheng H. J., Bagri A., Yaron A., Stein E., Pleasure S. J., Tessier-Lavigne M. (2001). Plexin-A3 mediates semaphorin signalling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* 32(2): 249-263
- Cho C., Willis W. D., Goulding E. H., Jung-Ha H., Choi Y. C., Hecht N. B., Eddy E. M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 28: 82-86
- Christensen M. E., Rattner J. B., Dixon G. H. (1984). Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucleic Acid Res* 12(11): 4575-4592

- Clermont Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112: 35-51
- Collas P., Poccia D. (1998). Remodeling the sperm nucleus into male pronucleus at fertilization. *Theriogenology* 49: 67-81
- Colleu D., Lescoat D., Boujard D., Le Lannou D. (1988). Human spermatozoal nuclear maturity in normozoospermia and asthenozoospermia. *Arch Androl* 21(3): 155-162
- Cordell J. L., Falini B., Erber W. N., Ghosh A. K., Abdulaziz Z., MacDonald S., Pulford K. A., Stein H., Manson D. Y. (1984). Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32(2): 219-229
- Corzett M., Mazrimas J., Balhorn R. (2002). Protamine1 : Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 61: 519-527
- Cox G. F., Bürger J., Lip V., Mau U. A., Sperling K., Wu B., Horsthemke B. (2002). Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 71(1): 162-164
- Dadoue J. P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Res Technol* 61: 56-75
- Davie J. R. (1998). Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev* 8: 173-178
- Davie J. R., Spencer V. A. (1999). Control of histone modifications. *J Cell Biochem, Suppl* 32-33: 141-8
- DeBaun M. R., Niemitz E. L., Feinberg A. P. (2003). Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 72(1): 156-160
- Del Castillo E. B., Trabuco A., de la Balze F. A. (1947). Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells. *J Clin Endocr* 7: 493-502
- Delaval K., Govin J., Cerqueira F., Rousseaux S., Khochbin S., Feil R. (2007). Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO* 26(3) : 720-729
- Delmas V., Laoide B., Masquillier D., deGroot R. P., Foulkes N. S., Sassone-Corsi P. (1992). Alternative usage of initiation codons in CREM generates regulators with opposite functions. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 89: 4226-4230
- De Rycke M., Liebaers I., Van Steirteghem A. (2002). Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod* 17(10): 2487-2494

- Dhalluin C., Carlson J. E., Zeng L., He C., Aggarwal A. K., Zhou M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399(6735): 491-496
- Dobson A. T., Raja R., Abeyta M. J., Taylor T., Shen S., Haqq C., Pera R. A. (2004). The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Hum Mol Genet* 13(14): 1461-1470
- Drabent B., Kardalidou E., Bode C., Doenecke D. (1995). Association of histone H4 genes with the mammalian testis-specific H1t histone gene. *DNA Cell Biol* 14: 591-597
- Drabent B., Saftig P., Bode C., Doenecke D. (2000). Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochem Cell Biol* 113: 433-442
- Duggan D. J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1, Suppl: 10-14
- Fantz D. A., Hatfield W. R., Horvath G., Kistler M. K., Kistler W. S. (2001). Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol Reprod* 64: 425-431
- Fawcett D. W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44: 394-436
- Felsenfeld G., Groudine M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421(6921): 448-453
- Fenic I., Sonnack V., Failing K., Bergmann M., Steger K. (2004). In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J Androl* 25: 811-818
- Forsberg E. C., Downs K. M., Christensen H. M., Im H., Nuzzi P. A., Bresnick E. H. (2000). Developmentally dynamic histone acetylation pattern of a tissue-specific chromatin domain. *Proc. Natl. Aca. Sci U.S.A* 97(26): 14494-14499
- Foulkes N. S., Mellstrom B., Benusiglio E., Sassone-Corsi P. (1992). Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature* 355: 80-84
- Frank S. R., Schroeder M., Fernandez P., Taubert S., Amati B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* 15: 2069-2082
- Freifelder D. (1982). *Physical Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, San Francisco: 492-572
- Gardiner-Garden M., Ballesteros M., Gordon M., Tam P. P. (1998). Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol* 18: 3350-3356
- Gatewood J. M., Cook G. R., Balhorn R., Schmid C. W., Bradbury E. M. (1990). Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histone. *J Biol Chem* 265: 20665-20666
- Gatewood J. M., Cook G. R., Balhorn R., Bradbury E. M., Schmid C. W. (1987). Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236: 962-964

- Gey G. O., Coffman W. D., Kubicek M. T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer research* 12: 264-265
- Govin J., Caron C., Lestrat C., Rousseaux S., Khochbin S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 271: 3459-3469
- Graumann P. L., Marahiel M. A. (1998). A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* 23: 286-290
- Grimes S. R. Jr., Smart P. G. (1985). Changes in structural organization of chromatin during spermatogenesis in the rat. *Biochim Biophys Acta* 824(2): 128-139
- Griswold M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9: 411-416
- Grunewald S., Paasch U., Glander H. J., Anderegg U. (2005). Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 37: 69-71
- Guenther M. G., Lebine S. S., Bover L. A., Jaenisch R., Young R. A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130(1): 77-88
- Gurtner A., Fuschi P., Magi F., Colussi C., Gaetano C., Dobbstein M., Sacchi A., Piaggio G. (2008). NF-Y dependent epigenetic modifications discriminate between proliferating and postmitotic tissue. *PloS One* 3(4): e2047
- Gusse M., Sautiere P., Belaiche D., Martinage A., Roux C., Dadoune J. P., Chevaillier P. (1986). Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta* 884: 124-134
- Haidl G., Krause S. (1998). 2.5 Untersuchung des Ejakulates. In: *Andrologie*, 3. Auflage, Krause W., Weidner W. F. (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart: 9-14
- Hammoud S. S., Nix D. A., Zhang H., Purwar J., Carell D. T., Cairns B. R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460(7254): 473-478
- Haynes S. R., Dollard C., Winston F., Beck S., Trowsdale J., David I. B. (1992). The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 20(10): 2603
- Hazzouri M., Rousseaux S., Mongelard F., Usson Y., Pelletier R., Faure A. K., Vourc'h C., Sele B. (2000). Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol Reprod Dev* 55: 307-315
- Hazzouri M., Pivot-Pajot C., Faure A. K., Usson Y., Pelletier R., Sele B., Khochbin S., Rousseaux S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* 79: 950-960
- Hees H., Sinowatz F. (2000). *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln

- Hebbes T. R., Thorne A. W., Crane-Robinson C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 7(5): 1395-1402
- Hebbes T. R., Clayton A. L., Thorne A. W., Crane-Robinson C. (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken B-globin chromosomal domain. *EMBO J* 13(8): 1823-1830
- Hecht N., Behr R., Hild A., Bergmann M., Weidner W., Steger K. (2009). The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for histone and protamine expression during human spermatogenesis. *Hum Reprod* 24(3): 536-545
- Heidaran M. A., Showman R. M., Kistler W. S. (1988). A cytochemical study of the transcriptional and translational regulation of nuclear transition protein (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *J Cell Biol* 106(5): 1427-1433
- Heintzman N. D., Stuart R. K., Hon G., Fu Y., Ching C. W., Hawkins R. D., Barrera L. O., Van Calcar S., Qu C., Ching K. A., Wang W., Weng Z., Green R. D., Crawford G. E., Ren B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39(3): 311-318
- Henkel R. R., Franken D. R., Lombard C. J., Schill W. B. (1994). Selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: a possible therapeutic modality for male-factor cases? *J Assist Reprod Genet* 11(8): 395-400
- Hennig W., Ausió J. (2003). Sperm nuclear proteins. *Chromosoma* 111: 471-472
- Heras A., Roach C. M., Key M. E. (1995). Enhanced polymer detection system for immunohistochemistry. *Lab Invest* 72: 165
- Hofmann N., Hilscher B. (1991). Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 6(7): 979-982
- Hofmann N., Hilscher B., Mörchen B., Schuppe H.-C., Bielfeld P. (1995). Comparative studies on various modes of classification of morphology of sperm heads and results in invitro fertilization -a preliminary report. *Andrologia* 27(1): 19-23
- Holdcraft R. W., Braun R. (2004). Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 27: 335-342
- Holstein A. F., Schirren C. (1983). Histological evidence of testicular biopsies. In Schirren C., Holstein A. F. (Hrsg.), *Fortschritte der Andrologie*. Grosse-Verlag, Berlin
- Holstein A. F., Roosen-Runge E. C., Schirren C. (1988). *Illustrated Pathology of human spermatogenesis*. Grosse-Verlag Berlin
- Hoyer-Fender S., Costanci C., Pehrson J. R. (2000). Histone MacroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp Cell Res* 258: 254-260
- Hsu S. M., Raine L., Fanger H. (1981). Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580

- Iguchi N., Tanaka H., Yomogida K., Nishimune Y. (2003). Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int J Androl* 26: 354-365
- Jacobson R. H., Ladurner A. G., King D. S., Tjian R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288: 1422-1425
- Jason L. J., Moore S. C., Lewis J. D., Lindsey G., Ausio J. (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* 24: 166-174
- Jenuwein T., Allis C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080
- Jiang C., Pugh B. F. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation advances through genomics. *Nat Rev Genet* 10: 161-172
- Johnson S. G. (1970). Testicular biopsy score count -a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 355 hypogonadal males. *Hormones* 1: 2-25
- Jones M. H., Numata M., Shimane M. (1997). Identification and characterisation of BRDT: a testis-specific gene related to bromodomain genes RING3 and *Drosophila* fsh. *Genomics* 45: 529-534
- Kennedy B. P., Davies P. L. (1980). Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J Biol Chem* 255: 2533-2539
- Kennedy B. P., Davies P. L. (1981). Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J Biol Chem* 256: 9254-9259
- Khara K. K., Vlad M., Griffiths M., Kennedy C. R. (1997). Human protamines and male infertility. *J Assist Reprod Genet* 14: 282-290
- Khochbin S. (2001). Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271: 1-12
- Kimmins S., Sassone-Corsi P. (2005). Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434 (7033): 583-589
- Kogan S., Trifonov E. N. (2005). Gene splice sites correlate with nucleosome positions. *Gene* 352: 57-62
- Köhn F.-M., Schuppe H.-C., Jung A., Pflieger-Bruss S., Eberl M., Schill W.-B., Neumann N. J., Hofmann B. (2002). *Das Spermiogramm. Praktische Anleitungen. 2. Auflage, Text der CD-ROM „Das Spermiogramm“*(2002). Technische Universität München, Justus-Liebig-Universität Gießen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Koppel D. A., Wolfe S. A., Fogelfeld L. A., Merchant P. S., Prouty L., Grimes S. R. (1994). Primate testicular histone H1t are highly conserved and the human H1t gene is located on chromosome 6. *J Cell Biochem* 2: 219-230
- Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4): 693-705

- Kurdistani S. K., Tavazoie S., Grunstein M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* 117(6): 721-733
- Krause W., Weidner W. (Hrsg.) (1998). *Andrologie. Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*. 3. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685
- Lalancette C., Miller D., Li Y., Krawetz S. A. (2008). Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem* 104(5): 1570-1579
- Lambard S., Galeraud-Denis I., Martin G., Levy R., Chocat A., Carreau S. (2004). Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod* 10(7): 535-541
- Laoide B. M., Foulkes N. S., Schlotter F., Sassone-Corsi P. (1993). The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J* 12: 1179-1191
- Lee C. H., Cho Y. H. (1999). Aspects of mammalian spermatogenesis: electrophoretic analysis of protamines in mammalian species. *Mol Cell* 9: 556-559
- Lee J. H., Hart S. R., Skalnik D. G. (2004). Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis* 38: 32-38
- Lee T. I., Jenner R. G., Boyer L. A., Guenther M. G., Lenie S. S., Kumar R. M., Chevalier B., Johnstone S. E., Cole M. F., Isono K., Koseki H., Fuchikami T., Abe K., Murray H. L., Zucker J. P., Yuan B., Bell G. W., Herbolsheimer E., Hannett N. M., Sun K., Odom D. T., Otte A. P., Volkert T. L., Bartel D. P., Melton D. A., Gifford D. K., Jaenisch R., Young R. A. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125: 301-313
- Le Lannou D., Blanchard Y. (1988). Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 84(2): 551-556
- Lescoat D., Blanchard Y., Lavault M. T., Quernée D., Le Lannou D. (1993). Ultrastructural and immunocytochemical study of P1 Protamin localization in human testis. *Andrologia* 25(2): 93-99
- Lewis J. D., Abbott D. W., Ausio J. (2003a). A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol* 81: 131-140
- Lewis J. D., Song Y., de Jong M. E., Bagha S. M., Ausió J. (2003b). A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 111: 473-482
- Li B., Carey M., Workman J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128(4): 707-719
- Li Y., Lalancette C., Miller D., Krawetz S. A. (2008). Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl* 10: 535-541

- Liang G., Lin J. C., Wei V., Yoo C., Cheng J. C., Nguyen C. T., Weisenberger D. J., Egger G., Takai D., Gonzales F. A., Jones P. A., (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101(19): 7357-7362
- Lin Q., Sirotkin A., Skoultchi A. I. (2000). Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol Cell Biol* 20: 2122- 2128
- Lin Q., Inselman A., Han X., Xu H., Zhang W., Handel M. A., Skoultchi A. I. (2004). Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *J Biol Chem* 279: 23525-25532
- Liu C. L., Kaplan T., Kim M., Buratowski S., Schreiber S. L., Friedman N., Rando O. J. (2005). Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* 3(10): e328
- Liu T., Kuljaca S., Tee A., Marshall G. M. (2006). Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev* 32: 157-165
- Loidl P., Grobner P. (1987). Postsynthetic acetylation of histones during the cell cycle: a general function for the displacement of histones during chromatin rearrangements. *Nucleic Acids Res* 15: 8351-8366
- Lottspeich F., Zorbas H. (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Mahadevaiah S. K., Turner J. M., Baudat F., Rogakou E. P., de Boer P., Blanco-Rodrigues J., Jasin M., Keeney S., Bonner W. M., Burgoyne P. S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27: 271-276
- Manson D. Y., Stein H., Naiem M., Abdulaziz Z. (1981). Immunohistological analysis of human lymphoid tissue by double immunoenzymatic labelling. *J Cancer Res Clin Oncol* 101(1): 13-22
- Marcon L., Boissonneault G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 70: 910-918
- Margueron R., Trojer P., Reinberg D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 15: 163-176
- Marques C. J., Carvalho F., Sousa M., Barros A. (2004). Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 363: 1700-1702
- Martianov I., Brancorsini S., Catena R., Gansmuller A., Kotaja N., Parvinen M., Sassone-Corsi P., Davidson I. (2005). Polar nuclear localization of HIT2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 102: 2808-2813
- Masquillier D., Foulkes N. S., Mattei M. G., Sassone-Corsi P. (1993). Human CREM gene: evolutionary conservation, chromosomal localization, and inducibility of the transcript. *Cell Growth Differ* 4: 931-937

- Matsumoto K., Wolffe A. P. (1998). Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol* 8: 318-323
- Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403: 501-502
- McGarvey K. M., Fahrner J. A., Greene E., Martens J., Jenuwein T., Baylin S. B. (2006). Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res* 66: 3541-3549
- McLay D. W., Clarke H. J. (2003). Remodeling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 125: 625-33
- McPherson S., Longo F. J. (1993). Chromatin structure-function alteration during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *EU J Histochem* 37: 109-128
- Meistrich M. L., Trostle-Weige P. K., Lin R., Bhatnagar Y. M., Allis C. D. (1992). Highly acetylated H4 associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* 31: 170-181
- Meistrich M. L., Mohapatra B., Shirley C. R., Zhao M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111: 483-488
- Menkveld R., Stander F. S., Kotze T. J., Kruger T. F., van Zyl J. A. (1990). The evaluation of morphological characteristic of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 5(5): 586-592.
- Merighe G. K., Biase F. H., Santos-Biase W. K., Miranda M. S., de Bem T. H., Watanabe Y. F., Meirelles F. V. (2009). Gene silencing during development of in vitro-produced female bovine embryos. *Genet Mol Res* 8(3): 1116-1127
- Meshorer E., Yellajoshula D., George E., Scambler P. J., Brown D. T., Mistelli T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* 10: 105-116
- Miller D. (2000). Analysis and significance of messenger RNA in human ejaculated spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 56, Suppl 2: 259-264
- Miller D., Ostermeier C., Krawetz S. A. (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends in Mol Med* 11(4): 156-163
- Morinière J., Rousseaux S., Steuerwald U., Soler-López M., Curtet S., Vitte A. L., Govin J., Gaucher J., Sadoul K., Hart D. J., Krijgsveld J., Khochbin S., Müller C. W., Petosa C. (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 461(7264): 664-668

- Morton K. M., Herrmann D., Sieg B., Struckmann C., Maxwell W. M., Rath D., Evans G., Lucas-Hahn A., Niemann H., Wrenzycki C. (2007). Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Mol Reprod Dev* 4(8): 931-940
- Nagl W. (1980). *Chromosomen. Organisation, Funktion und Evolution des Chromatins*. 2. neubearbeitete und erweiterte Auflage. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- Nahkuri S., Taft R. J., Mattick J. S. (2009). Nucleosomes are preferentially positioned at exon in somatic and sperm cells. *Cell Cycle* 8(20): 3420-3424
- Nantel F., Monaco L., Foulkes N. S., Masquilier D., LeMeur M., Henriksen K., Dierich A., Parvinen M., Sassone-Corsi P. (1996). Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 380: 159-162
- Nieschlag E., Behre H. M. (2000). *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Nishida H., Suzuki T., Kondo S., Miura H., Fujimura Y., Hayashizaki Y. (2006). Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell. *Chromosome Res* 14(2): 203-211
- Nishida H., Kondo S., Suzuki T., Tsujimura Y., Komatsu S., Wakayama T., Hayashizaki Y. (2008). An epigenetic aberration increased in intergenic regions of cloned mice. *Mamm Genome* 19(10-12): 667-674
- O'Carroll D., Scherthan H., Peters A. H., Opravil S., Haynes A. R., Laible G., Rea S., Schmid M., Lebersorger A., Jerratsch M., Sattler L., Mattei M. G., Denny P., Brown S. D., Schweizer D., Jenuwein T. (2000). Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* 20: 9423-9433
- O'Geen H., Nicolet C. M., Blahnik K., Green R., Farnham P. J. (2006). Comparison of sample preparation methods for chip-chip assays. *Biotechniques* 41: 557-580
- Onyango P., Jiang S., Uejima H., Shamblott M. J., Gearhart J. D., Cui H., Feinberg A. P. (2002). Monoallelic expression and methylation of imprinted genes in human and mouse embryonic germ cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 99(16): 10599-10604
- Orlando V., Strutt H., Paro R. (1997). Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* 11: 205-214
- Orlando V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* 25: 99-104
- Ostermeier G. C., Dix D. J., Miller D., Khatri P., Krawetz S. A. (2002). Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *The Lancet* 360: 772-77
- Ostermeier G. C., Miller D., Huntriss J. D., Diamond M. P., Krawetz S. A. (2004). Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 429: 154

- Oswald J., Engemann S., Lane M., Mayer W., Olek A., Fundele R., Dean W., Reik W., Walter J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10: 475-478
- Pantke P., Diemer T., Marconi M., Bergmann M., Steger K., Schuppe H.-C., Weidner W. (2008). Testicular sperm retrieval in azoospermic men. *Eur Urol Suppl* 7(12): 703-714
- Paradowska A., Fenic I., Konrad L., Sturm K., Wagenlehner F., Weidner W., Steger K. (2009). Aberrant epigenetic modifications in the CTCF binding domain of the IGF/H19 gene in prostate cancer compared with benign prostate hyperplasia. *Int J Oncol* 35(1): 87-96
- Parthun M. R., Widom J., Gottschling D. E. (1996). The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: link to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87: 85-94
- Perl A. (2007). The pathogenesis of transaldolase deficiency. *IUBMB Life* 59(6): 365-373
- Peters A. H., O'Carroll D., Scherthan H., Mechtler K., Sauer S., Schofer C., Weipoltshammer K., Pagani M., Lachner M., Kohlmaier A., Opravil S., Doyle M., Sibilia M., Jenuwein T. (2001). Loss of the suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107: 323-337
- Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 9: 2002-2007
- Pittoggi C., Renzi L., Zaccagnini G., Cimini D., Degrassi F., Giordano R., Magnano A. R., Lorenzini R., Lavia P., Spadafora C. (1999). A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci* 112: 3537-3548
- Pivot-Pajot C., Caron C., Govin J., Vion A., Rousseaux S., Khochbin S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 23(15): 354-365
- Powell D., Cran D. G., Jennings C., Jones R. (1990). Spatial organization of repetitive DNA sequences in the bovine sperm nucleus. *J. Cell Sci* 97(1):185-191
- Prigent Y., Muller S., Dadoune J. P. (1996). Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2(12): 929-935
- Prigent C., Dimitrov S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* 116: 3677-3685
- Premkumar E. B., Bhargava P. M. (1972). Transcription and translation in bovine spermatozoa. *Nat New Biol* 240: 139-143
- Quinn P., Warnes G. M., Kerin J. F., Kirby C. (1985). Culture factors affecting the success of in vitro fertilization and embryo transfer. *Ann N Y Acad Sci* 442:195-204
- Ragakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Iwanowa V. S., Bonner W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858-5868

- Regha K., Sloane M. A., Huang R., Pauler F. M., Warczok K. E., Melikant B., Radolf M., Martens J. H., Schotta G., Jenuwein T., Barlow, D. P. (2007). Active and repressive chromatin are interspersed without spreading in an imprinted gene cluster in mammalian genome. *Mol Cell* 27(3): 353-366
- Reik W., Walter J. (2001). Genomic imprinting: paternal influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2: 21-32
- Roh T. Y., Ngau W. C., Cui K., Landsman D., Zhao K. (2004). High-resolution genome-wide mapping of histone modifications. *Nat Biotechnol* 22(8): 1013-1016
- Roh T. Y., Cuddapah S., Zhao K. (2005). Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev* 19(5): 542-552
- Roh T. Y., Cuddapah S., Cui K., Zhao K. (2006). The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 103(43): 15782-15787
- Rousseaux S., Caron C., Govin J., Lestrat C., Faure A. K., Khochbin S. (2004). Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 345(2): 139-153
- Rousseaux S., Reynoird N., Escoffier E., Thevenon J., Caron C., Khochbin S. (2008). Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online* 16(4): 492-503
- Roux C., Gusse M., Chevaillier P., Dadoune J. P. (1988). An antiserum against protamines for immunohistochemical studies of histone to protamine transition during human spermatogenesis. *J Reprod Fertil* 82(1): 35-42
- Russel L. D., Ettl R. A., Sinha Hikim A. P., Clegg E. D. (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater FL
- Ruthenburg A. J., Li H., Patel D. S., Allis C. D. (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 983-994
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf. S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H.A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
- Santos F., Peters A. H., Otte A. P., Reik W., Dean W. (2005). Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol* 280(1): 225-236
- Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister A. J., Sherriff J., Bernstein B. E., Emre N. C., Schreiber S. L., Mellor J., Kouzarides T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419(6905): 407-411
- Sarkar S., Nelson A. J., Jones O. W. (1977). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity of human sperm. *J Med Genet* 14: 250-255

- Schreiber S. L., Bernstein B. E. (2002). Signaling network model of chromatin. *Cell* 111(6): 771-778
- Segel H. (1976). *Biochemical calculations*. John Wiley and Sons, New York: 324-353
- Sha J., Zhou Z., Li J., Yin L., Yang H., Hu G., Luo M., Chan H. C., Zhou K. (2002). Identification of testis development and spermatogenesis related genes in human and mouse testes using cDNA arrays. *Mol Hum Reprod* 8: 511-517
- Shahbazian M. D., Grunstein M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76: 75-100
- Shang E., Salzar G., Crowley T. E., Wang X., Lopez R. A., Wang X., Wolgemuth D. J. (2004). Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of bromodomain-containing genes BRD2, BRD3, BRD4, and BRDT in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* 4: 513-509
- Shang E., Nickerson H. D., Wen D., Wang X., Wolgemuth D. J. (2007). The first bromodomain of BRDT, a testis specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* 134: 3507-3515
- Shi Y. Q., Wang Q. Z., Liao S. Y., Zhang Y., Liu Y. X., Han C. S. (2006). In vitro propagation of spermatogonial stem cells from KM mice. *Front Biosci* 11: 2614-2622
- Sigg C. (1979). Klassifizierung tubulärer Hodenatrophien bei Sterilitätsabklärungen. Bedeutung der sogenannten bunten Atrophie. *Schweiz med Wschr* 109: 1284-1293
- Simon R. H., Camerini-Otero R. D., Felsenfeld G. (1978). An octamer of histones H3 and H4 forms a compact complex with DNA of nucleosome size. *Nucleic Acids Res* 5(12): 4805-4818
- Simpson R. T., Bustin M. (1976). Histone composition of chromatin subunits studied by immunosedimentation. *Biochemistry* 15(19): 4305-4312
- Sims R. J., Nishioka K., Reinberg D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 19: 629-639
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85
- Sonnack V., Failing K., Bergmann M., Steger K. (2002). Expression of hyperacetylated histone 4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 34: 384-390
- Soon L. L., Ausio J., Breed W. G., Power J. H., Muller S. (1997). Isolation of histones and related chromatin structures from spermatozoa nuclei of a dasyurid marsupial, *Sminthopsis crassicaudata*. *J Ex Zool* 278: 322-332
- Steger K., Klonisch T., Gavenis K., Drabent B., Doenecke D., Bergmann M. (1998a). Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 4(10): 939-945

- Steger K., Aleithe I., Behre H., Bergmann M. (1998b). The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 4(3): 227-233
- Steger K. (1999). Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol* 199: 471-487
- Steger K., Pauls K., Klonisch T., Franke F. E., Bergmann M. (2000). Expression of protamine 1 and 2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 6(3): 219-225
- Steger K., Failing K., Klonisch T., Behre H. M., Manning M., Weidner W., Hertle L., Bergmann M., Kliesch S. (2001). Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA. *Hum Reprod* 16: 709-716
- Steger K., Fink L., Failing K., Bohle R. M., Kliesch S., Weidner W. (2008). Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol Hum Reprod* 9: 331-336
- Strahl B. D., Allis C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45
- Suzuki T., Kondo S., Wakayama T., Cizdziel P. E., Hayashizaki Y. (2008). Genome-wide analysis of abnormal H3K9 acetylation in cloned mice. *PloS One* 3(4): e1905
- Swann K., Saunders C. M., Rogers N. T., Lai F. A. (2006). PLCzeta (zeta): A sperm protein that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 17: 264-273
- Tanphaichitr N., Sobhon P., Taluppeth N., Chalermisarachai P. (1978). Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 117: 347-356
- Taverna S. D., Li H., Ruthenburg A. J., Allis C. D., Patel D. J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* 14: 1025-1040
- Tekur S., Pawlak A., Guellaen G., Hecht N. B. (1999). Contrin, the human homologue of a germ-cell Y-box-binding protein: cloning, expression, and chromosomal localization. *J Androl* 20(1): 135-144
- Thein S. L., Wallace R. B. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: *Human Genetic Diseases: A practical approach*. IRL Press
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 76: 4350-4354
- Turner B. M. (1991). Histone acetylation and control of gene expression. *J Cell Sci* 99: 13-20
- Turner B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22: 836-845
- Turner B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-291
- Vakoc C. R., Mandat S. A., Olenchock B. A., Blobel G. A. (2005). Histone H3 lysine methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* 19(3): 381-391

- Valls E., Sanchez-Molina S., Martinez-Balbas M. A. (2005). Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis. *J Biol Chem* 280: 42592-42600
- van der Heijden G. W., Derijck A. A., Ramos L., Giele M., van der Vlag J., de Boer P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol* 298: 458-469
- van der Heijden G. W., Ramos L., Baart E. B., van den Berg I. M., Derijck A. A., van der Vlag J., Martini E., de Boer P. (2008). Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 8: 34
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034. Epub 2002 Jun
- van Roijen H. J., Ooms M. P., Spaargaren M. C., Baarends W. M., Weber R. F., Grootegoed J. A., Vreeburg J. T. (1998). Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum Reprod* 13: 1559-1566
- Wade P. A., Pruss D., Wolffe A. P. (1997). Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci* 22(4): 128-132
- Waimey K. E., Huang P. H., Chen M., Cheng H. J. (2008). Plexin-A3 and plexin-A4 restrict the migration of the sympathetic neurons but not their neural crest precursors. *Dev Biol* 315(2): 448-458
- Wang Z., Zang C., Rosenfeld J. A., Schones D. E., Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T. Y., Peng W., Zhang M. Q., Zhao K. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* 40(7): 897-903
- Ward W. S., Coffey D. S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44: 569-74
- Ward W. S. (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 48: 1193-1203
- Wawrzik M., Spiess A. N., Herrmann R., Buiting K., Horsthemke B. (2009). Expression of SNURF-SNRPN upstream transcripts and epigenetic regulatory genes during human spermatogenesis. *Eur J Hum Genet* 17(11): 1463-70
- Wennemuth G., Aumüller G. (1998). 1.1. Endokrine Organe. In: *Andrologie*. 3. Auflage, Krause W., Weidner W. F. (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart: 9-14
- WHO (Hrsg.) (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th edn, Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Wiekowski M., Miranda M., dePamphilis M. L. (1993). Requirements for the promoter activity in mouse oocytes and embryos distinguish paternal pronuclei from maternal and zygotic nuclei. *Dev Biol* 159: 366-378

- Wiencke J. K., Zheng S., Morrison Z., Yeh R. F. (2008). Differentially expressed genes are marked by histone 3 lysine 9 trimethylation in human cancer cells. *Oncogene* 27: 2412-2421
- Witt O., Albig W., Doenecke D. (1996). Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res* 229: 301-306
- Wolfe S. A., Anderson J. V., Grimes S. R., Stein G. S., Stein J. S. (1989). Comparison of the structural organization and expression of germinal and somatic rat histone H4 genes. *Biochim Biophys Acta* 1007: 140-150
- Wolfe A. P., Dimitrov S. (1993). Histone-modulated gene activity: developmental implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3: 167-191
- Wolfe A. P. (1998). *Chromatin structure and function*. Academic Press, New York
- Wolff H. (1995). The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 63: 1143-1157
- Wolffe A. P. (1994). Inheritance of chromatin states. *Dev Genet* 15: 463-470
- Wu J., Wang S. H., Potter D., Liu J. C., Smith L. T., Wu Y. Z., Huang T. H. M., Plass C. (2007). Diverse histone modifications on histone 3 lysine 9 and their relation to DNA methylation in specifying gene silencing. *BMC Genomics* 8: 131-140
- Wykes S. M., Krawetz S. A. (2003). The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 278: 29471-29477
- Xin L., Zhou G. L., Song W., Wu S. X., Wei G. H., Hao D. L., Lv X., Liu D. P., Liang C. C. (2007). Exploring cellular memory molecules marking component and active transcriptions. *BMC Mol Biol* 8: 31
- Yang J., Medvedev S., Reddi P. P., Schultz R. M., Hecht N. B. (2005). The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102: 1513-1518
- Yang J., Medvedev S., Yu J., Schultz R. M., Hecht N. B. (2006). Deletion of the DNA/RNA-binding protein MSY2 leads to post-meiotic arrest. *Mol Cell Endocrin* 250: 10-24
- Zalenskaya I. A., Bradbury E. M., Zalensky A. O. (2000). Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 213-218
- Zalensky A. O., Allen M. J., Kobayashi A., Zalenskaya I. A., Balhorn R. (1995). Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 103: 577-590
- Zalensky A. O., Siino J. S., Gineitis A. A., Zalenskaya I. A., Tomilin N. V., Yau P., Bradbury E. M. (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 277: 43474-43480
- Zhang X., San Gabriel M., Zini A. (2006). Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl* 27: 414-420

Zheng Y., Yuan W., Zhou Z., Xu M., Sha J. H. (2005). Molecular cloning and expression of a novel alternative splicing variant of BRDT gene. *Int J Mol Med* 15(2): 315-321

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 04.01.2010

Cornelia Steilmann

Danksagung

Herzlichen Dank an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. K. Steger, für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die Hilfe bei der Durchführung.

Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Dr. R. Renkawitz für die Übernahme der Zweitbetreuung (im Rahmen des Gießener Graduierten-Kollegs Lebenswissenschaften) und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Einen besonders lieben Dank auch an Dr. Marcia C. O. Cavalcanti und Dr. Marek Bartkuhn für die Hilfe bei fachlichen Problemstellungen und für zahlreiche gute Vorschläge.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den Koautoren der aus dieser Arbeit entstandenen Publikationen für die Zusammenarbeit.

Zudem danke ich der ganzen Arbeitsgruppe und allen beteiligten Personen für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinem Freund Marco für die mentale Unterstützung danken.