

Barbara Bug  
Dr. sc. hum.

## Molekulare Funktionsanalyse von *DDX3X* und *DDX3Y* in der Human-Spermatogenese

Fach/Einrichtung: Frauenheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr. med. T. Strowitzki

Die Spermatogenese ist ein komplexer Prozess, in dem Transkriptions- und Translationskontrollmechanismen keimzellspezifischer Gene eine wichtige Rolle spielen. Durch diese Genregulation wird gewährleistet, dass Spermatogenese-relevante Gene in der richtigen Keimzellphase exprimiert werden. Wird die Expression dieser Gene beeinflusst, kann dies zu einer gestörten Spermatogenese führen.

Ein Resultat der gestörten Spermatogenese ist Azoospermie, welche durch einen Verlust der Spermien im Ejakulat definiert wird. Bei Männern mit Azoospermie kann eine Hodenbiopsie durchgeführt werden, um durch die testikuläre Spermienextraktion (TESE) reife Spermien für das ICSI-Verfahren zu erhalten. Dabei werden in ca. 40 % der Patienten, welche eine TESE vollziehen, keine Spermien gefunden. Um die Bewertung der Hodenbiopsien durch den Pathologen zu unterstützen, werden molekulare Marker benötigt, welche die Existenz von reifen Spermien anzeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb keimzellspezifische postmeiotische Gene (*ACT*, *ADAD1*, *BOULE*, *BPY2*, *BRDT*, *CDY1*, *CREM*, *DAZ*, *DAZL*, *DDX25*, *HIT2*, *HILSI1*, *MAEL*, *PABP3*, *PAPOLB*, *PLC $\zeta$ 1*, *PRM1*, *PRM2*, *PTBP2*, *RBMY*, *SMC1 $\beta$* , *UPF3A*, *YBX2*,  *$\tau$ CSTF-64*) quantitativ und qualitativ untersucht, um durch deren Expressionsprofil eine verbesserte pathologische Beurteilung zu ermöglichen. Zusätzlich wurde analysiert, ob keimzellspezifische Transkriptvarianten des Y-chromosomalen *DDX3Y* sowie des X-chromosomalen *DDX3X* als molekulare Marker eingesetzt werden können. Materielle Grundlage der gesamten Analyse waren RNA-Pools, welche aus Hodenbiopsien von Patienten mit sogenannter schwerer Hypospermatogenese (Sigg Grad 1-5; 2-5; 1-4), Patienten mit postmeiotischem Spermatogenese-arrest (Sigg Grad 2a) und Patienten mit vollständiger Spermatogenese (Sigg Grad 1) extrahiert wurden.

Sowohl *DDX3Y*, als auch *DDX3X* zeigte Veränderungen im Expressionsprofil der Transkriptvarianten. Auffällig war hierbei ein verändertes 3' UTR Spleißmuster der *DDX3X* Transkriptvarianten in den TESE-Proben. Diese variablen 3' UTR Spleißprofile konnten in sechs Gruppen (A-F) eingeordnet werden. Bei Patienten, die aufgrund ihres Spleißmusters Gruppe A zugewiesen wurden, konnte in allen TESE-Proben Spermien nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass dieses 3' UTR Spleißmuster der *DDX3X* Transkripte einen Hinweis auf vorhandene Spermien liefern könnte. Zugleich lässt eine Veränderung des 3' UTR Spleißprofils keinen Rückschluss auf den Verlust von Spermien zu. So konnten z. B. auch in einigen Gewebeproben mit Spleißprofilen der Gruppe B und C Spermien nachgewiesen werden. In Hodenbiopsien der Gruppen D, E und F konnten, bis auf zwei Ausnahmen, keine Spermien und Spermatiden gefunden werden. Diese Spleißmuster sind vermutlich aufgrund einer gestörten Meiose vorzufinden.

*DAZ* zeigte zudem in allen TESE-Proben, einschließlich Sigg Grad 1, eine große Variabilität im Expressionsprofil des *DAZ*-Repeats. Diese unterschiedlichen Expressionsmuster kommen durch alternatives Spleißen zustande und können zur Expression polymorpher Proteine führen. Ob dieses variable Expressionsmuster durch Azoospermie verursacht wird oder auf eine polymorphe Anzahl der *DAZ*-Repeats in jedem Mann zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Dazu müsste eine signifikante Anzahl weiterer

Gewebeproben mit normaler Spermatogenese auf das vorhandene *DAZ* Expressionsprofil analysiert werden.

Bei der Analyse keimzellspezifischer Gene war ein variables Expressionsprofil nur für die Gene *ADAD1*, *BOULE*, *BPY2*, *BRDT*, *CDY1*, *CREM* und *PLCζ1* sichtbar. War dabei die Anzahl der Keimzellen (vor allem postmeiotische) reduziert, so zeigte sich zumeist eine Verminderung in der Expression.

Zusammenfassend weisen Hodenbiopsien mit reduzierter Keimzellanzahl eine verminderte oder keine Expression der hier analysierten Gene auf. Diese variablen Expressionsprofile scheinen eher ein Maß für das Vorhandensein postmeiotischer Keimzell-Mengen darzustellen, als für die in der Pathologie definierten Sigg Grade. Zusätzlich könnten variable 3' UTR Spleißprofile von *DDX3X* Transkripten als Keimzellmarker genutzt werden. So könnte z. B. das *DDX3X* 3' UTR Spleißprofil der Gruppe A ein Hinweis auf vorhandene Spermien liefern. Desweiteren wird durch die hier gewonnen Ergebnisse empfohlen, für eine molekulare Analyse einer vollständigen Spermatogenese eine Kombination verschiedener Gene (z. B. *ADAD1*, *BOULE*, *BPY2*, *BRDT*, *CDY1*, *CREM*, *PLCζ1*) heranzuziehen. Eine Analyse weiterer Gewebeproben ist jedoch notwendig, um diese Aussagen zu unterlegen.