

Masterarbeit

Genetische Aspekte der Infertilität und ihre Untersuchung mittels unterschiedlicher Methoden

eingereicht von

Dr. Christine Chung, MPH

zur Erlangung des akademischen Grades MSc

an der

Medizinische Universität Graz

ausgeführt im Rahmen des

Universitätslehrgang Medizinische Genetik 2020/2021

unter der Anleitung von

Mag. Dr. Paul Dremsek, MSc

Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. Erwin Petek

Wien, am 08.06.2023

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Formulierungen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese schriftliche Arbeit wurde noch an keiner Stelle vorgelegt.

Wien, am 08.06.2023

Dr. Christine Chung, MPH

Zwei Dinge sollten Kinder von ihren Eltern bekommen:

Wurzeln und Flügel.

Johann Wolfgang von Goethe

Danke

An dieser Stelle bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinem Betreuer Paul Dremsek. Er zeigte mir mit viel Geduld den Weg der Entstehung einer Masterarbeit. Besonders durch seine Leidenschaft für sein Fach, sein umfassendes Wissen und seine Fähigkeit Neulingen die Basis gut zu erklären, haben mir in dieser Zeit sehr geholfen.

Ich bedanke mich auch bei allen Kolleginnen und Kollegen des Studienlehrganges für die Gemeinschaft in der kurzen, aber doch intensiven Zeit.

Besonderer Dank gilt auch den Organisatorinnen und Organisatoren des Lehrganges. Dadurch hatte auch ich die Möglichkeit, mich mit dieser Materie unter kontrollierten Bedingungen näher zu beschäftigen.

Aus tiefstem Herzen bedanke ich mich bei meinen Kindern Malu und Yannick, die geduldig zugesehen haben, wenn ich anderwärtig beschäftigt war und mir immer die Zeit und Freiheit zugestehen, die ich, natürlich in tolerierbaren Grenzen, beanspruche. Mit Dankbarkeit und Stolz wage ich zu vermuten: Sie können bereits gut fliegen.

Zusammenfassung

Seit Jahren kann man beobachten, dass Frauen in gebärfähigem Alter ihren Kinderwunsch erst in höherem Alter oder gar nicht nachzukommen versuchen. Neben der bewussten Entscheidung gegen Nachkommenschaft, gibt es auch Umstände, die zu Fertilitätsstörung oder wiederkehrendem Schwangerschaftsverlust führen. Auch die gesellschaftliche Umstrukturierung, wie zum Beispiel die Rollenveränderung der Frau und damit verbunden die spätere Realisierung des Kinderwunsches, tragen zu einer Veränderung der Altersverteilung in der Gesellschaft bei. Sinkende Geburtenraten sorgen in Kombination mit einer höheren Lebenserwartung für eine zunehmend älter werdende Bevölkerung, ein Trend, der derzeit durch Zuwanderung abgeschwächt wird. Jedoch sinkt mit zunehmendem Alter die Fertilität bei beiden Geschlechtern: sowohl die Qualität der weiblichen Eizellen als auch die Spermienqualität beim Mann geht zurück und kann zu Infertilität, wiederkehrenden Schwangerschaftsverlusten, aber auch zu vermehrtem Auftreten von spontanen genetischen Erkrankungen bei den Kindern führen.

Der unerfüllte Kinderwunsch durch Infertilität oder wiederkehrende Schwangerschaftsverluste führen oftmals zu großem psychischem Stress der Partner. Außerdem können sie zu einer beträchtlichen finanziellen Belastung des Paares und des Gesundheitssystems führen. Untersuchungen, die die Ursachen von eingeschränkter Reproduktionsfähigkeit erkennen können, sind daher von hohem Wert. Insbesondere, da in Kombination mit derzeit möglichen Therapiemöglichkeiten (wie z.B. mit künstlichen Reproduktionshilfen) oftmals Auswege geboten werden können.

Der unerfüllte Kinderwunsch kann eine Vielzahl von Ursachen haben und erstreckt sich von anatomischen Fehlbildungen im Bereich der weiblichen und männlichen Reproduktionsorgane, bis hin zu Infektionen. Diese können sowohl vorübergehende als auch permanente Ursachen für eine gestörte Fertilität sein, da sie, wie z.B. Chlamydien Infektionen, zu Verwachsungen in der Bauchhöhle führen können. Auch hormonelle Faktoren können eine Ursache von insbesondere der weiblichen Infertilität darstellen: Eisprung, Befruchtung und Einnistung sind stark hormonell

gesteuerte Prozesse. Ein Beispiel für zunehmendes hormonelles Ungleichgewicht, das Polycystische Ovar Syndrom, kann zu fehlenden Eisprüngen oder verändertem Aufbau der Gebärmutterschleimhaut führen. Dadurch wird Befruchtung oder die Einnistung nach Befruchtung erschwert. Für dieses Syndrom werden mitunter auch genetische Ursachen diskutiert.

Auf genetische Ursachen für unerfüllten Kinderwunsch und die Suche danach wird in dieser Arbeit besonders eingegangen. Diese können indirekt zu den oben beschriebenen Ursachen führen. Sie können aber auch eigene Krankheitsbilder oder isoliert auftretende Fertilitätsstörungen verursachen. Die dazu führenden genetischen Ursachen sind vielfältig und erstrecken sich von numerischen Chromosomenanomalien wie der Monosomie X und des XXY-Karyotyps, über balancierte Translokationen bis hin zu genverändernden Sequenzmutationen. Diese ungewöhnliche Vielfalt an genetischen Ursachen bedarf zu ihrer Detektion einer ebenso großen Vielfalt der Diagnosemethoden. Hierzu stehen mittlerweile einige moderne und sehr unterschiedliche Methoden zur Verfügung, allerdings wird in der Routine in Österreich nur ein Bruchteil für Patient/innen mit Fertilitätsstörungen genutzt: so finden neben der klassischen Chromosomenanalyse kaum weitere Untersuchungen Anwendung. In dieser Arbeit wird ein möglicher Nutzen anderer, zusätzlicher Methoden wie die der Whole Genome Sequencing, Whole Exome Sequencing und die Untersuchung feinstruktureller Chromosomenveränderungen mittels Microarray und Optical Genome Mapping diskutiert.

Summary

For years, it has shown that women in their reproductive age do not attempt their desire to have children until they get older, or not at all. In addition to a conscious decision not to have children also circumstances that lead to fertility problems or recurrent pregnancy loss could be the reason. Social restructuring, like the women's roles and with this the postponing of reproduction do contribute to a change in the age distribution in society. Decreasing birth rates and higher life expectancy are resulting in an increasingly aging population, a trend that is currently mitigated by immigration.

However, fertility declines with age in both sexes: female oocyte quality and male sperm quality decline and can lead to infertility, recurrent pregnancy losses, but also to increased incidence of genetic diseases of the offspring.

Unfulfilled desire to have children due to infertility or recurrent pregnancy losses often lead to great psychological stress for the partners. The financial burden for the couple and the health care system should also be mentioned. Examinations to identify the causes of impaired reproduction are therefore of very high value. Especially since in combination with currently available therapeutic options such as artificial reproductive support, ways out can often be offered.

The causes for childlessness can range from anatomical malformation of the male and female reproductive organs to infections. These can be both temporary and permanent causes of impaired fertility, as they can lead to adhesions in the abdominal cavity, such as infections with Chlamydia Trachomatis.

Hormonal factors can also be a cause of particularly female infertility since ovulation, fertilization and implantation are processes that are strongly controlled by hormones. One example of increasing hormonal imbalance, polycystic ovary syndrome, can lead to periods without ovulation or altered endometrial structure. This can hinder fertilization or implantation after fertilization. It is currently under debate whether this syndrome has genetic causes.

This thesis deals with genetic causes of unfulfilled wish to have children and in particular the search for them. Genetic causes can lead to the causes described above indirectly. However, they can also cause their own clinical pictures or isolated

fertility disorders. The genetic causes leading to these disorders are diverse and range from numerical chromosomal abnormalities such as monosomy X and the XXY karyotype, to balanced translocations, to gene altering sequence mutations. This unusual variety of genetic causes requires an equally large variety of diagnostic methods to detect them. Currently, several modern and very diverse methods are available for this purpose, however, only a small part of them is used in the routine for patients with fertility disorders in Austria: thus, hardly any other tests are used besides the classical chromosome analysis. In this thesis, the possible use of other, additional methods such as whole genome sequencing, whole exome sequencing and the investigation of fine-structural chromosomal alterations by means of microarray and optical genome mapping will be discussed.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	5
Summary.....	7
1.0 Ursachen von Reproduktionsstörungen.....	11
1.1 Nicht genetische Ursachen.....	11
1.1.1 Noxen aus der Umwelt.....	11
1.1.2 Drogen.....	12
1.1.3 Medikamente.....	13
1.1.4 Infektionen.....	13
1.1.5 Anatomische Fehlbildungen der Genitalorgane.....	14
1.1.6 Immunologische Faktoren.....	15
1.1.7 Thrombophilie.....	16
1.1.8 Hormonhaushalt.....	17
1.1.9 Enometriose.....	18
1.2 Genetische Ursachen.....	19
1.2.1 Klinefelter Syndrom, 47,XXY.....	20
1.2.2 Mit Infertilität assoziierte strukturelle Veränderung des Y-Chromosoms..	20
1.2.3 Turner Syndrom, 45,X.....	22
1.2.4 Balancierte Translokationen.....	23
1.2.4.1 Robertson´sche Translokation.....	24
1.2.5 Monogene Sequenzvarianten als genetische Ursache.....	26
1.2.5.1 Zystische Fibrose.....	26
1.2.5.2 Methylen Tetrahydrofolat Reduktase Mangel.....	27
1.2.5.3 Primär Ziliäre Dyskinesie.....	28
1.2.6 Störungen in der Meiose.....	29
2.0 Genetische Untersuchungsmethoden.....	31

2.1 Karyotypisierung.....	31
2.2 FISH Analyse (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung).....	35
2.3 Microarray.....	36
2.4 NGS (Next Generation Sequencing).....	38
2.5 Optical Genome Mapping (OGM).....	40
3.0 Diskussion.....	43

1.0 Ursachen von Reproduktionsstörungen

Als Reproduktionsstörung versteht man sowohl reduzierte Fertilität, Infertilität und das vermehrte Auftreten von spontanen Aborten. Die Ursachen sind bei beiden Geschlechtern zu finden und können nahezu jedes System, das im Prozess der Reproduktion beteiligt ist, betreffen. So können unter anderem Organsysteme, hormonelle Regelkreise und immunologische Prozesse betroffen sein, was nicht zwingend unmittelbar auf eine genetische Störung zurückzuführen ist.

Einige der nichtgenetischen Ursachen sind schon lange bekannt und gut in den Untersuchungsprozess bei der Abklärung von Reproduktionsstörungen integriert. Im Folgenden seien die wichtigsten Ursachen beschrieben.

1.1 Nichtgenetische Ursachen

Nichtgenetische Ursachen sind meistens erworben und umfassen unter anderem Infektionen, chemische Exposition oder Strahlenexposition. Sie können jedoch auch anatomische Ursachen haben, was zwar seinerseits genetisch bedingt sein kann, jedoch im engeren Sinn nicht als genetische Störung gilt.

1.1.1 Noxen aus der Umwelt

Noxen aus der Umwelt, wie zum Beispiel physikalische Faktoren, wie Strahlenbelastung, oder chemische Giftstoffe, können Aborte oder funktionelle Schäden beim Kind verursachen. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Einwirkens kann Schwangerschaftsverlust oder funktioneller Schaden verursacht werden.

Ionisierende Strahlen können teratogene, mutagene oder auch kanzerogene Wirkung zeigen. Hierbei ist besonders die biologisch wirksame Dosis zu beachten. Bei chemischen Faktoren spielt neben der Dosis und der Zeitpunkt und Rahmen der Exposition auch die genetische Prädisposition eine Rolle, da durch sie die Empfindlichkeit gegenüber eventuellen Noxen maßgeblich beeinflusst werden

kann. Alkoholgenuss kann auch in geringen Mengen zu Schwangerschaftsverlusten führen, wenn er in für das Fortbestehen der Schwangerschaft kritischen Zeiträumen erfolgt. Auch ist das Auftreten syndromaler Erkrankungsbilder bei den Kindern, wie das fetale Alkoholsyndrom (FAS) möglich. Dieses zeichnet sich besonders durch intellektuelle Einschränkung und Verhaltensstörungen aus. Eine Heilung gibt es nicht, allerdings kann eine deutliche Besserung durch früh einsetzende Unterstützung in der Entwicklung erreicht werden (Wilhoit LF et al, 2017).

1.1.2 Drogen

Neben der unbewussten Exposition von fertilitätsmindernden bzw. fruchtschädigenden Substanzen kann zusätzlich eine bewusste Einnahme von Drogen erfolgen. So ist beispielsweise bekannt, dass maternaler Kokain-Abusus zu Aborten, Frühgeburten, vorzeitiger Plazentalösung und Totgeburten führen kann. Die Wirkung des plazentagängigen Kokains liegt in der Gefäßverengung, wodurch es zu verminderter utero-plazentarer Durchblutung kommen kann sowie auch zur Azidose. Beides bewirkt einen Sauerstoffmangel beim Fetus. Durch die Unterversorgung kommt es auch zu vermindertem intrauterinem Wachstum, was sich in vermindertem Kopfumfang zeigt und zu Schäden bei überlebenden Kindern führt (Smid MC et al, 2019).

Ebenso verursacht maternaler Tabakgenuss oft fetale Wachstumsretardierung, was das Risiko von Aborten erhöht. So konnte gezeigt werden, dass Kinder von Raucherinnen intrauterin deutlich kleiner sind betreffend Kopfumfang, Oberschenkellänge und erwartetem Geburtsgewicht. Weiters konnte ein erhöhtes Risiko für Asthma in Studien nachgewiesen werden. Auch die Inzidenz der angeborenen Herzfehler ist deutlich erhöht bei Kindern, die intrauterin den Schadstoffen von Zigaretten ausgesetzt waren. Bei den Studien wurden teilweise aktives und passives Rauchen berücksichtigt. Weiters werden auch über mehrere Generationen wirksame Langzeiteffekte in Betracht gezogen (Abraham M et al 2017).

1.1.3 Medikamente

Antiepileptika, Antikoagulantien, Schmerzmittel und auch Psychopharmaka können zur Schädigung der Frucht selbst oder zu Störungen der Versorgung der Gebärmutter und der Schwangerschaft bedingen. Niedriges Geburtsgewicht, verzögerte Entwicklung und Fehlbildungen von Körperteilen oder des ganzen Kindes können daraus resultieren. Ein bekanntes Beispiel lieferte das in den 1960er Jahren in Deutschland rezeptfrei erhältliche Thalidomid, welches schwangeren Frauen als Beruhigungsmittel verabreicht wurde. Das Medikament bewirkte sowohl vermehrt Totgeburten als auch zum Teil starke Missbildungen der Arme und Beine bei betroffenen Kindern (Haervig KB et al, 2014).

1.1.4 Infektionen

Infektionen der werdenden Mutter sind ebenfalls oft mit intrauterinen Schädigungen des Kindes bis hin zum Abort assoziiert. Hier sind besonders Infektionen durch Röteln-Virus, Parvovirus B19, Cytomegalievirus, Varizella-Zoster-Virus, HIV, Syphilis und Toxoplasmose hervorzuheben. Durch diaplazentaren Übertritt der Krankheitserreger kann der Fetus in der Entwicklung gestört werden oder sogar ein Schwangerschaftsverlust die Folge sein, während sie bei der schwangeren Frau selbst keine Symptome verursachen. Bei der Cytomegalie-Infektion hat die Mutter kaum Symptome, allenfalls die ähnlich einer Erkältung, beim Kind kann sie jedoch zu neurologischen Entwicklungsstörungen führen. Ein Schutz dagegen besteht bei Schwangeren, die bereits eine Infektion durchgemacht haben und entsprechend protektiv wirksame IgG-Antikörper gebildet haben (Beaudoin ML et al, 2021).

Eine Röteln-Infektion während der Schwangerschaft kann einerseits bei starker Reaktion zum Verlust des Kindes führen oder ein typisches Krankheitsbild verursachen, welches besonders durch die drei charakteristischen Symptome Katarakt, Herzfehler und sensorineurale Schwerhörigkeit gekennzeichnet ist (Winter AK et al 2022).

Weitere organische Ursachen für Infertilität bei sowohl Mann als auch Frau können rezidivierende Infektionen mit zum Beispiel Chlamydia Trachomatis oder Neisseria Gonorrhoe sein. Chlamydia Trachomatis ist eines der häufigsten sexuell übertragenen Keime. Hierbei entscheidet unter anderem die Rezidivhäufigkeit, die Effektivität der Behandlungen und auch die Art der Begleitinfektionen über den Einfluss der Infektion auf die Reproduktionsfähigkeit (Menon S et al, 2015).

Obwohl rezidivierende Infektionen besonders zur Beeinträchtigung der Reproduktion bei der Frau führen, sind auch Männer von dauerhafter Unfruchtbarkeit durch häufige Episoden sexuell übertragbarer Infektionen betroffen, insbesondere bei Erkrankungen, die zu rezidivierender Prostatitis führen (Motrich RD et al, 2018).

1.1.5 Anatomische Fehlbildungen der Genitalorgane

Neben den schädigenden Einflüssen von externen Stoffen, darf man anatomische Gegebenheiten, die eine Schwangerschaftsentstehung erschweren, nicht außer Acht lassen. Oftmals sind die möglichen genetischen und nicht-genetischen Ursachen dafür ungeklärt. Während der Embryonalperiode werden bei beiden Geschlechtern die Müller'schen Gänge angelegt. Bei männlich determinierten Embryonen wird durch die Produktion des Anti-Müller-Hormons aus den Sertolizellen, den Gewebszellen des Hodens, die Rückbildung initialisiert.

Die Entwicklungsstörung der weiblichen Geschlechtsorgane im Embryonalstadium kann zu Fehlbildungen im Bereich der Müller'schen Gänge führen. Dies kann seinerseits zu verschiedenen Ausprägungen der inneren und äußeren Genitalorgane führen. Ein wichtiges, mit starken Fehlbildungen einhergehendes, Frauen betreffendes Syndrom wäre das Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrom mit Agenesie der Vagina und des Uterus oder Septum-Bildung in der Gebärmutter. Insbesondere bei diesem Syndrom wird eine genetische Ursache angenommen und danach intensiv gesucht (Jacquinet A, et al 2020). Auch bei geringgradiger Ausprägung von Veränderungen, wie zum Beispiel Uterus Septus oder Uterus Subseptus kann es zu wiederholtem Schwangerschaftsverlust kommen (Shulman LP, 2008).

Der wiederholte Schwangerschaftsverlust bei Uterus Septus wird unter anderem dadurch erklärt, dass die Durchblutung im Bereich des zusätzlichen Gewebes vermindert ist (Brali H. et al, 2020). Eine vorausgehende operative Sanierung zeigt oft eine deutliche Verbesserung der Fertilitätsrate (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Collaborators expand, 2016).

1.1.6 Immunologische Faktoren

Eine weitere in der Literatur diskutierte Rolle spielen immunologische Faktoren. Als Beispiele sollen hier Gene des Killer Cell Immunoglobulin-like-receptors-(KIR)-Clusters und die *HLA-C*-Gene genannt werden. Man fand ein vermehrtes Vorkommen des KIR-Haplotyps B bei Männern mit Oligozoospermie, also eine verminderte Anzahl funktionstüchtiger Spermien im Ejakulat. Der Haplotyp A wird durch die KIR-Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* und *KIR2DP1* charakterisiert und wirkt auf die NK-Zelle inhibierend bei Liganden Bindung. Im Gegensatz dazu wird der Haplotyp B durch die Gene *KIR2DL2*, *KIR2DL5A/B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* und *KIR3DS1K* charakterisiert, die auch eine aktivierende Wirkung auf die NK-Zelle haben können. Die genaue Komposition der unterschiedlichen KIR-Gene, sowie ihre Anzahl im Cluster, ist individuell unterschiedlich. Der zugrunde liegende Mechanismus der Oligozoospermie ist nicht vollständig bekannt, es wird jedoch angenommen, dass es zur Infertilität aufgrund von Entzündungsreaktionen in Hoden, Vas deferens oder Nebenhoden kommt. Es wird vermutet, dass diese durch zytotoxische NK (Natural Killer) -Zellen und T-Zellen ausgelöst werden, ermöglicht durch die aktivierend wirkenden KIR-Rezeptoren des Haplotyps B (Wilczyńska K et al, 2020). Neben anatomischen Veränderungen und Dysfunktion des Urogenitaltraktes, kann auf diese Weise die Anzahl, die Mobilität und die Morphologie der Spermien beeinträchtigt sein.

Das Immunsystem der Gebärmutter ist im ersten Trimester dominiert von Natural Killer-Zellen. Diese können, wie beschrieben, KIRs mit inhibierender oder aktivierender Funktion produzieren. Fetale Trophoblastzellen aus der äußeren Schicht der Keimblase verbinden sich mit der Gebärmutter Schleimhaut zur Einnistung und exprimieren HLA-C Moleküle. Fetale, vom Vater vererbte HLA-C

Moleküle können durch maternale, aktivierende KIRs erkannt werden, die eine gegen den Fetus gerichtete Immunreaktion auslösen können. Durch IVF ist die Abwehrreaktion jedoch möglicherweise signifikant geringer (Piekarska K et al, 2021).

Die maternalen NK-Zellen in der Gebärmutterschleimhaut produzieren, während der Plazentations-Periode KIRs, die an fetale HLA-C Moleküle an den einwandernden Trophoblastzellen binden können. Das Signal, das die NK-Zellen von paternal vererbten HLA-Cs des Trophoblasten bekommen, ist abhängig vom Verhältnis von aktivierenden zu hemmenden KIR-Genen, und ist wichtig für die Erhaltung des Gleichgewichts zwischen mütterlichem Überleben und Ernährung des Kindes. Ein Ungleichgewicht zugunsten hemmender KIR-Gene, wird öfter bei Müttern mit defekter Plazentation gefunden, wie zum Beispiel bei Präeklampsie, Fetaler Wachstumsretardierung oder Spontanaborten. Aufgrund des Einflusses auf Schwangerschaftsentstehung wird von einigen IVF-Instituten die Abklärung des immunologischen Status vor einer Behandlung erwägt. Interessant ist diese Beobachtung im Falle einer Eizellspende, da hier das Immunsystem statt auf einen fremden Satz HLA-C Moleküle, auf zwei trifft (Vargas RG et al, 2009).

1.1.7 Thrombophilie

Störungen des Gerinnungssystems der Mutter konnten mit wiederholten Schwangerschaftsverlusten, erfolglosen Befruchtungen oder IVF-Versuchen in Zusammenhang gebracht werden. Ursächlich könnte ein Ungleichgewicht in der Immunhomöostase sein, aber auch auf genetischer Ebene zu finden sein. Durch Gerinnungsstörungen werden Prozesse wie Remodeling der Gebärmutter-Arterien oder Plazentation ungünstig beeinflusst (Alecsandru D et al 2021; Han AR et al, 2021). Die Thrombophilie-Diagnostik ist eine der ersten Schritte im Zuge der Abklärung bei wiederholtem Schwangerschaftsverlust und umfasst die Untersuchung sowohl aktivierender als auch hemmender Faktoren in der Gerinnungskaskade.

1.1.8 Hormonhaushalt

In der Schwangerschaftsentstehung spielt auch die hormonelle Stoffwechsellage eine große Rolle.

Das Polycystische Ovar Syndrom ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Abklärung von Zyklusstörungen und Fertilität gerückt und beschreibt eine hormonelle Stoffwechsellage, bei der Symptome wie Hyperandrogenismus, irreguläre Menstruationszyklen und Insulinresistenz beschrieben werden können (Zehravi M et al, 2021). Dabei dürfte besonders die diabetische Stoffwechsellage von großer Bedeutung sein, da dadurch ein zentraler Hypogonadismus mit darauffolgender Amenorrhoe und Infertilität entstehen kann. Durch eine Verbesserung der Stoffwechsellage kann auch die ovarielle Funktion wieder verbessert werden. Dies wird vor allem in der Therapie des Polycystischen Ovar Syndroms und des Hyperandrogenismus genutzt (Thong EP et al, 2019).

Gonadotropine sind auch wichtig für die Entwicklung der Spermatozyten. Sertoli Zellen weisen FSH (Follikel stimulierendes Hormon) Rezeptoren und Androgen Rezeptoren auf. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl FSH als auch Testosteron für die Spermienbildung notwendig sind. Speziell bei der Proliferation der Spermatogonien dürften die Gonadotropine zusammen mit Leydig-cell-derived-growth Faktoren und Epidermal-growth-factor-like Growth Faktoren eine unterstützende Wirkung entfalten. Die Letztgenannten zählen zu den Wachstumsfaktoren. So konnte gezeigt werden, dass Clomifen, ein selektiver Östrogen Rezeptor Modulator, Humanes Chorion Gonadotropin und Aromatase Inhibitoren die Spermatogenese verbessern können (Shiraishi K et al, 2017; Corona G et al, 2018; Simoni M et al, 1999).

Die Gonaden unterliegen der Steuerung durch die Steroidhormone, welche in der Nebennierenrinde gebildet werden. Ein Defekt der Steroidhormonproduktion kann sowohl in weiblichen als auch in männlichen Individuen Infertilität verursachen (Marsh CA et al, 2014).

Diabetes mellitus, als Störung der Insulinproduktion in den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse oder verminderte Sensitivität der Insulinrezeptoren im Gewebe, wird ebenfalls mit verminderter Erfüllung des Kinderwunsches in

Verbindung gebracht. Bisher wurden mindestens 75 unabhängige Genloci gefunden, die für die Entstehung von Typ II Diabetes verantwortlich sind. Während das bereits oben erwähnte PCOS bei der Frau oft mit einer diabetischen Stoffwechsellaage einher geht, dürfte eine diabetische Stoffwechsellaage beim Mann die Funktion der Sertoli Zellen und somit die Spermienbildung negativ beeinflussen (Dinulovic D et al, 1990).

Hormonstörungen können unter anderem auch beim Klinefelter Syndrom und beim "46,XX Testicular/Ovo-Testicular Disorder of Sex Development" vorliegen. Hierbei kommt es zu Azoospermie. Als Azoospermie wird das totale Fehlen von Spermien im Ejakulat bezeichnet (Sironen A et al, 2020). Diese kann bedingt sein durch Störung der hypothalamisch-hypophysären Achse in der Spermien Bildungsregulation, primär quantitativen Spermienogenese oder durch urogenitale Obstruktionen. Grob können obstruktive und nicht obstruktive Azoospermie voneinander unterschieden werden. Die nicht obstruktive Azoospermie kann sich histologisch als Sertoli-Cell-Only Syndrom (SCOS), als Reifungsstörung oder als Hypospermatogenese zeigen. Ursächlich können neben chromosomalen Störungen, durchgemachte Infektionen, Hormonstörungen oder auch Enzymveränderungen vorliegen.

1.1.9 Endometriose

Ein anderes Erkrankungsbild, das im letzten Jahrzehnt zunehmend präsenter geworden ist, ist die Endometriose. Die Endometriose ist eine chronische Erkrankung der Frau, bei der, aufgrund von dislozierten Endometriumzellen, neben starken und schmerzhaften Blutungen, Organschäden durch Verwachsungen entstehen können. Es gibt mehrere Theorien zur Entstehung, wobei die Theorie der retrograden Menstruation die wichtigste zu sein scheint. Sowohl mechanische als auch genetische Ursachen spielen eine große Rolle. Die Diagnose erfolgt durch Ultraschall, MRT und wird letztendlich im Zuge einer laparoskopischen Exploration gesichert. Neben den mechanischen Barrieren und Schäden, die durch Endometriose entstehen können, wird auch eine mögliche genetische Ursache diskutiert. So konnten bei betroffenen Frauen genetische Veränderungen des Gens

HOXA10 gefunden werden, welches beteiligt ist daran das Endometrium wirklich zu gestalten. Auch Methylierungsmuster, die zur Stilllegung des Gens führen, ist mit reduzierter Fertilität assoziiert (Filip L et al, 2020; Bonavina G et al, 2022).

Durch therapeutische chirurgische Sanierung kann die Schwangerschaftsrate deutlich verbessert werden. Weitere Therapieerfolge werden derzeit teilweise durch Superovulation und Insemination und In-vitro-Fertilisation erreicht (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006; Macer ML et al, 2012).

1.2 Genetische Ursachen

Genetische Ursachen für unerfüllten Kinderwunsch finden sich in beiden Geschlechtern. Die Ursachen werden zu etwa gleichen Teilen bei beiden Geschlechtern erwartet (Duvuru et al. 2022; Solovova and Chernykh, 2022).

Oft sind die Eltern symptomlos und entdecken eine genetische Ursache erst bei der Untersuchung im Zuge der Fertilitätsabklärung.

Laut der American Society of Reproductive Medicine ist Infertilität ein Resultat einer Erkrankung (durch Fehlfunktion des Körpers, von Organen oder Systemen) des männlichen oder weiblichen Reproduktionstraktes, welche eine Konzeption oder das Austragen bis zur Geburt verhindert. Das Fehlen der Konzeption wird durch ein Ausbleiben einer Schwangerschaft trotz ungeschütztem Verkehr über 12 Monate definiert. Bei der Abklärung der männlichen Infertilität werden in „Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline“ genetische Ursachen berücksichtigt (Schlegel PN et al, 2021). Das Klinefelter Syndrom, welches mit Testosteronmangel, abnorm verteilter Muskelmasse, Autoimmunerkrankungen und fehlerhafte Spermatogenese einhergeht, wird hier neben Kryptorchismus als eine der ursächlich häufigeren Syndrome genannt. Bei der Untersuchung der männlichen Fertilität, Azoospermie oder Oligospermie wird aufgrund der oft zugrundeliegenden Karyotyp Abnormitäten eine genetische Untersuchung empfohlen. Weiters sind auch strukturelle Aberrationen, wie Deletionen, Duplikationen, Translokationen und Inversionen, auch submikroskopisch, als Ursache von Infertilität und unzureichender Spermatogenese möglich.

1.2.1 Klinefelter Syndrom, 47,XXY

Die genetische Ursache wurde schon in den 60er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts entdeckt. Gekennzeichnet ist es durch ein oder mehrere zusätzliche X-Chromosomen bei Männern und ist bei circa 11% der Azoospermie Patienten zu finden (Jan Murken et al, 2017; Morris JK et al, 2007; Thirumavalavan N et al, 2019). Beim Mosaik Typ des Klinefelter Syndroms, bei dem nur in einem Teil der Körperzellen ein atypischer Karyotyp vorzuweisen ist, ist es möglich, Spermien im Ejakulat finden und eine natürliche Befruchtung wäre theoretisch möglich, in Abhängigkeit der betroffenen Gewebetypen (Thirumavalavan N et al, 2019).

Das Klinefelter Syndrom kommt mit einer Häufigkeit von 1:500-1:1000, je nach Literatur, vor und bleibt relativ oft unerkannt (Morris JK et al, 2008). Bei 8% der Männer mit Klinefelter Syndrom findet man Spermien im Ejakulat (Morris JK et al; 2008). Mit dem Beginn der Pubertät wird den Patienten oft Testosteron verabreicht, um die Entwicklung der Geschlechtsorgane zu fördern. Dies reduziert jedoch die Bildung von Spermien.

Oft sind mit Beginn der Pubertät Spermien im Ejakulat nachweisbar. In der weiteren Entwicklung kommt es oft zu einem Verlust der Keimzellen und daher folglich zu verminderter Spermienbildung, die jedoch oft unerkannt bleibt, bis zu dem Zeitpunkt, an dem unerfüllter Kinderwunsch weitere Untersuchungen notwendig macht (Masterson TA 3rd et al, 2020; Pook CJ et al 2021). Falls ein Klinefelter-Karyotyp rechtzeitig entdeckt wird, kann eine Samenspende für die Erfüllung eines späteren Kinderwunsches mittels IVF assistiert werden.

1.2.2 Mit Infertilität assoziierte strukturelle Veränderungen des Y-Chromosoms

Mikrodeletionen am Y-Chromosom in den „AZF“- (Azoospermiefaktor)-Regionen können schwere Oligozoospermie oder Azoospermie verursachen. Die Abschnitte AZFa, AZFb und AZFc können hier unterschieden werden, wobei AZFc mit 60% die am häufigsten betroffene Region darstellt. AZFb betrifft 16% der Deletionen und AZFa 5% (Thirumavalavan N et al, 2019). AZFa enthält die Gene *USP9Y* (ubiquitin specific peptidase 9 Y-linked) und *DBY* (DEAD box protein3, Y-chromosomal), bei

deren Verlust es zu einem kompletten Verlust der Keimzellen kommt (Thirumavalavan N et al, 2019).

Bei 50% der betroffenen Männer mit AZFc Deletion kann man im Testes Gewebe Veränderungen im Sinne von Sertoli-Cell-only Syndrom an den Spermien feststellen. Dies ist bei Männern mit AZFa-und AZFb-Deletion nicht nachweisbar. Eine Differenzierung der Subtypen scheint demnach sinnvoll zu sein (Arnemann J et al, 1991; Sekido R. et al, 2014; Sekido R et al 2009).

Im Bereich der AZFc Region befindet sich unter anderem das Gen *DAZ1* (Deleted in Azoospermia) in einem Cluster. Das Gen ist Teil der DAZ-Familie, die für hochkonservierte RNA-Bindungsproteine codieren (*BOULE*, *DAZL*, *DAZ*). Die Gene *DAZ1-4* liegen am Y-Chromosom. Die anderen Gene der DAZ-Familie liegen auf den Autosomen (*BOULE* auf Chromosom 2, *DAZL* auf Chromosom 3 als Einzelkopie). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Meiose (Reynolds N et al, 2005). Viele regulatorische Prozesse der Gametogenese finden post-transkriptionell statt, bei deren Alteration ein Sistieren der Transkription die Folge sein kann. Die vier *DAZ*-Gene am Y-Chromosom sind in insgesamt 2 Cluster geordnet, wobei jeder der Cluster ein Paar *DAZ*-Gene enthält (Reynolds N et al, 2005). PCR basierte Methoden können nur das komplette Fehlen eines Clusters entdecken, jedoch nicht partielle Deletionen oder Mutationen. Diese könnten jedoch auch die Transkription beeinflussen. Mittels FISH-Techniken konnte man partielle Deletionen darstellen (Fu XF et al, 2015). Durch PCR konnten Sequenzvarianten identifiziert werden (Fu XF et al, 2015). Die *DAZ* codierten Gene beeinflussen die Entwicklung der Keimzellen (Fu XF et al 2015). Der Verlust der *DAZ*-Gene ist assoziiert mit Azoospermie und Oligospermie. Wobei *DAZ1* und *DAZ2* für gravierende Oligozoospermie verantwortlich sein können. Der alleinige Verlust von *DAZ2* dürfte jedoch keine Konsequenzen nach sich ziehen, da es in der gleichen Häufigkeit bei fertilen und infertilen Männern gefunden wurde (Reynolds N et al, 2005). Hier dürfte der Verlust des *DAZ2* von den übrigen *DAZ*-Genen ausgeglichen werden. *DAZ3* und *DAZ4* Deletionen kommen relativ häufig vor und haben wahrscheinlich keinen Effekt auf die Fertilität (Reynolds N et al, 2005).

Über *DAZL* und *BOULE* Gene ist noch wenig bekannt. Ein Fehlen der *BOULE* Gene dürfte jedoch zu einem meiotischen Arrest führen (Reynolds N et al, 2005). *DAZL* ist für Oogenese und Spermatogenese wichtig. Der Verlust des *DAZL*-Gens kann möglicherweise für den Verlust der Keimzellen vor der Geburt und ein Sistieren der Spermatogonien in der Prophase der Meiose verantwortlich sein (Fu XF et al 2015).

In sehr seltenen Fällen kann bei phänotypischen Männern der Großteil des Y-Chromosoms fehlen. Das 46,XX Male Syndrome (Testicular Disorder of Sex Development), welches durch eine Translokation der geschlechtsbestimmenden Region des Y-Chromosoms auf das X-Chromosom verursacht wird, zeigt phänotypisch oft Kryptorchismus und Gynäkomastie. Die Sterilität entsteht, da die Regionen am Y-Chromosom, welche wichtig wären für die Spermatogenese, fehlen (Thirumavalavan N et al, 2019).

Der Verlust des Großteils des Y-Chromosoms bei diesem Syndrom entsteht durch Translokation von Genmaterial eines distalen Bereichs des kurzen Arms des Y-Chromosoms inclusive des *SRY*-Gens während der paternalen Meiose. Das Gen *SRY* (Sex Determining Region Y) hat die Funktion eines Transkriptionsaktivators in der Entwicklung der Hoden, genauer, der Sertoli Zell Differenzierung. So kommt es durch das Vorliegen des *SRY*-Gens zu einem männlichen Phänotyp, auch wenn der Rest des Y-Chromosoms fehlt. Diese Männer sind jedoch aufgrund des Fehlens der übrigen am Y-Chromosom lokalisierten Gene (z.B. AZF-Region) infertil (Sekido R et al, 2008).

1.2.3 Turner Syndrom, 45,X

Das Turner Syndrom hat eine Inzidenz von 1:2500 Lebendgeburten (Abraham M et al, 2017). Hauptursache ist der Turner Karyotyp, der nur ein X-Chromosom als einziges Geschlechtschromosom aufweist. Diese Ursache findet man bei 50% der Betroffenen (Abraham M et al, 2017). Das Turner-Syndrom kann so mild ausfallen, dass es erst im Zuge einer genetischen Abklärung bei wiederholten Schwangerschaftsverlusten oder fehlender Implantation entdeckt wird. Außerdem kann der Turner-Karyotyp im Mosaik mit einem unauffälligen, weiblichen Karyotyp vorliegen. Bei 10-11% entdeckt man neben Zellen mit nur einem X-Chromosom

auch Zellen mit sowohl einem X- als auch einem Y-Chromosom. Strukturelle Veränderungen des X-Chromosoms wie das Vorliegen eines Isochromosoms sind ebenfalls mögliche Ursachen für ein Turner-Syndrom. In diesem Fall liegen statt zwei unauffälligen X-Chromosomen nur ein unauffälliges X-Chromosom und ein sogenanntes Isochromosom vor. Hierbei fehlt der kurze Arm dieses X-Chromosoms. Stattdessen ist eine weitere Kopie des langen Arms des X-Chromosoms vorhanden. Patientinnen mit normalem Phänotyp erkennt man oft im Zuge der Diagnostik bei wiederholtem Schwangerschaftsverlust oder fehlender Implantation der befruchteten Eizelle (Ding A et al, 2020; van Niekerk WA, 1978).

1.2.4 Balancierte Translokationen

Bei Trägern balancierter Translokationen kommt es oftmals zu Aborten und teilweise zum Auftreten von schweren Behinderungen. Solange keine Gene disruptiert werden, ist die Trägerin/der Träger der balanciert vorliegenden Translokation symptomlos. Allerdings kann es bei Trägern von balancierten Translokationen zu einer Oligozoospermie kommen.

Im Zuge der Meiose kann es jedoch zu einer Fehlverteilung kommen, was bei den Feten zu einem unbalancierten Vorliegen der Translokation und somit zu partiellen Trisomien und Monosomien führt. Ein Großteil der balancierten Veränderungen hat keine signifikanten Auswirkungen für die Träger selbst, da der Großteil der genomischen DNA keine Gene beinhaltet und die Wahrscheinlichkeit daher so gering ist, dass der Bruchpunkt einer balancierten Veränderung innerhalb eines Gens oder eines anderen wichtigen Bereichs liegt (Wilch ES et al, 2018; Liu J et al, 2021; Tunç E et al, 2022).

1.2.4.1 Robertson'sche Translokation

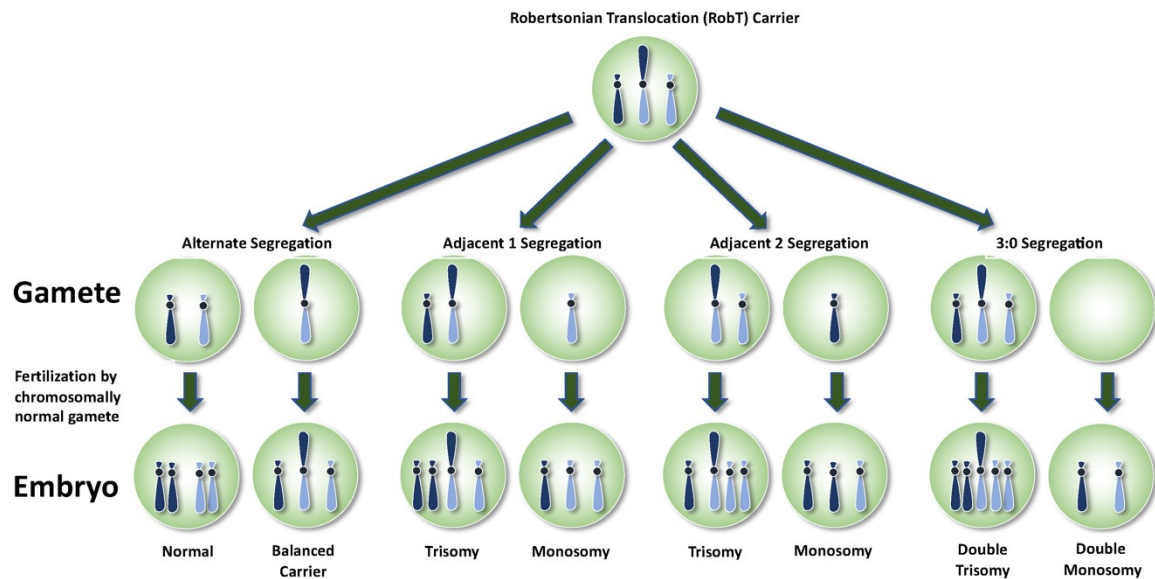


Abb 1: Robertson'sche Translokation zweier nicht spezifizierter akrozentrischer Chromosomen (dargestellt in dunkelblau und hellblau) ¹. Die Zelle in der obersten Zeile zeigt den diploiden Karyotyp der Trägerin/des Trägers. Die mittlere Zeile zeigt die möglichen, daraus resultierenden, haploiden Gameten. Die unterste Zeile zeigt die daraus resultierenden Verteilungen der beiden akrozentrischen Chromosomen in der Zygote nach Verschmelzung mit einem weiteren, unauffälligen haploiden Chromosomensatz. Zu beachten sind, dass neben Trisomien und Monosomien sowohl ein normaler Karyotyp als auch ein balancierter Karyotyp entstehen kann (links). Die Abbildung verzichtet zur Verdeutlichung auf die Darstellung aller nicht involvierten Chromosomen).

Ein Spezialfall der Translokation ist die Robertson'sche Translokation (Abb. 1). Sie bezeichnet den Austausch von genetischem Material zwischen zwei akrozentrischen Chromosomen. Das entstehende, derivative Chromosom besteht aus den langen Armen der involvierten akrozentrischen Chromosomen, die kurzen Arme gehen verloren. Bei TrägerInnen einer balancierten Robertson'schen Translokation findet man keinen über die kurzen Arme hinausgehenden Materialverlust. Da die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosome (also 13, 14, 15, 21 und 22) Gene für ribosomale DNA (rDNA) beinhalten, die in vielfacher Kopie vorkommen und nicht auf ein bestimmtes akrozentrisches Chromosom beschränkt sind, ist der Verlust mit keiner Änderung des Phänotyps verbunden (Abb. 2) (Antonarakis SE et al, 2022; Nurk S et al, 2022).

Bei der Fortpflanzung und damit verbundenen Meiose kann dann ein Chromosomensatz mit einem zusätzlichen oder fehlenden langen Arm entstehen

¹ Griffin, Darren K., Ogur, Cagri (2023) *PGT-SR: A Comprehensive Overview and a Requiem for the Interchromosomal Effect*. DNA, 3 (1). pp. 41-64. ISSN 2673-8856. (doi:10.3390/dna3010004) (KAR id:100514) mit der Creative Commons Lizenz

(Abb. 1). Die häufigsten Robertson'schen Translokationen betreffen die Chromosomen 13 und 14, bzw. 14 und 21. Die Translokation zwischen Chromosom 13 und 14 betrifft ca. 75% der Robertson'schen Translokationen. Die Inzidenz liegt bei 1-1,23 /1000 Neugeborenen.

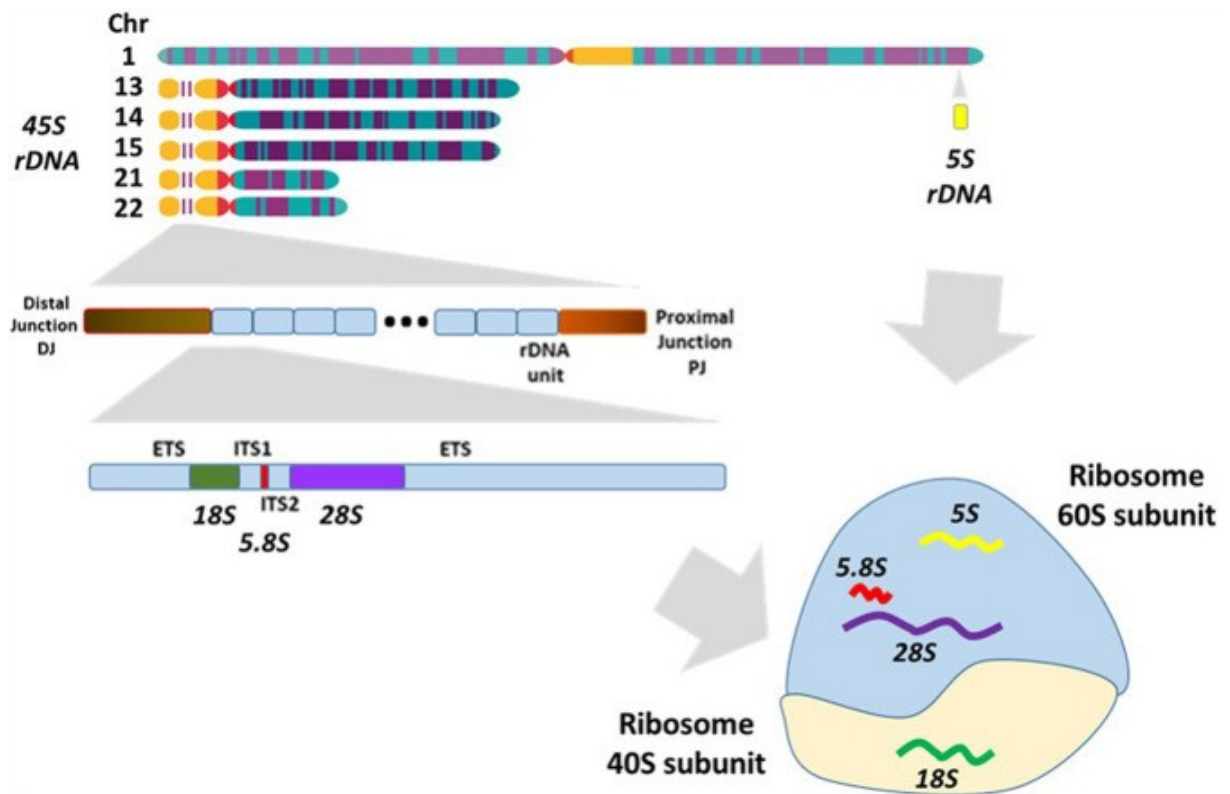


Abb 2.: Darstellung der Chromosomen, welche die rDNA codierenden Gene enthalten². Neben Chromosom 1 befinden sich diese in den Satellitenregionen der akrozentrischen Chromosomen.

Die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen enthalten, wie bereits erwähnt, repetitive DNA-Sequenzen, unter anderem auch ribosomale DNA. Schematisch dargestellt kann man hier sehen, dass die Information am kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen sich wiederholt. Daher ist ein Verlust eines Armes nicht mit phänotypischen Veränderungen assoziiert (Antonarakis SE et al, 2022; Wolff DJ et al, 1992; Stimpson KM et al 2014; McStay B et al, 2022).

² Antonarakis SE. Short arms of human acrocentric chromosomes and the completion of the human genome sequence. *Genome Res.* 2022 Apr;32(4):599-607. doi: 10.1101/gr.275350.121. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35361624; PMCID: PMC8997349 mit der Creative Commons Lizenz

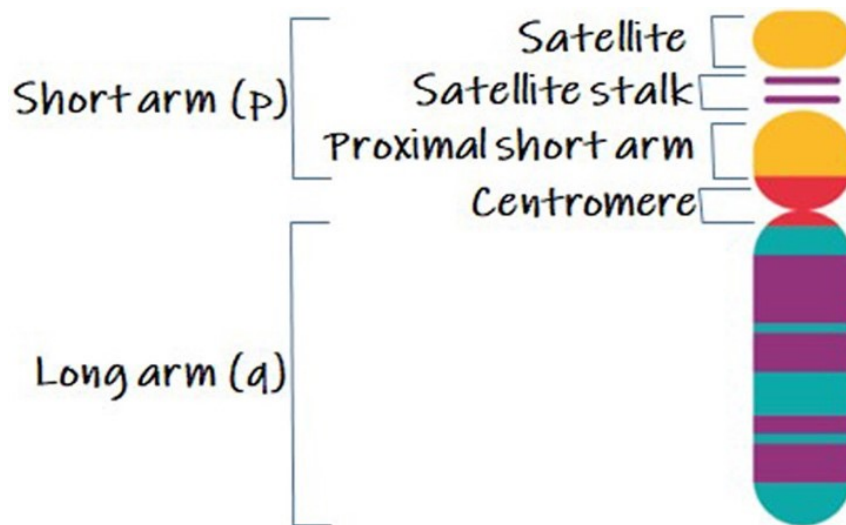


Abb 3: Schematische Darstellung eines akrozentrischen Chromosoms ³

1.2.5 Monogene Sequenzvarianten als genetische Ursachen

Neben den beschriebenen chromosomalen Aberrationen existiert eine Vielzahl an monogenen Mutationen, die zu reduzierter Fertilität oder rekurrenten Aborten führen können. Diese können entweder isoliert auftreten oder im Zuge eines komplexeren Krankheitsbildes auftreten.

1.2.5.1 Zystische Fibrose

Mutationen im Bereich des Cystic Fibrosis Conductance Regulator Gens (*CFTR*) ist eine häufige Ursache für männliche Infertilität. Die bekannte, schwerwiegende klinische Konsequenz von pathogenen *CFTR*-Mutationen ist das Ausbilden von Lungenerkrankungen und Verdauungsstörungen, die unbehandelt letal verlaufen können. Es kann jedoch entweder darüber hinaus oder ausschließlich zu

³ Antonarakis SE. Short arms of human acrocentric chromosomes and the completion of the human genome sequence. *Genome Res.* 2022 Apr;32(4):599-607. doi: 10.1101/gr.275350.121. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35361624; PMCID: PMC8997349 mit der Creative Commons Lizenz

Azoospermie aufgrund einer Aplasie des Vas Deferens führen. Das Ejakulat besteht in diesen Fällen hauptsächlich aus prostatiscem Sekret, die Samenbläschen sind meist verkleinert und Follikel Stimulierendes Hormon und Testosteron sind meist im Normbereich (Thirumavalavan N et al, 2019).

Erkrankungen, die auf das im Bereich q31.2 des Chromosoms 7 lokalisierten Genes zurückzuführen sind, werden autosomal rezessiv vererbt. Das *CFTR*-Gen codiert für einen Chloridionen Kanal, der in der Zellmembran von Epithelzellen vorkommt. In seiner normalen Funktion lässt er Chloridionen entlang des elektrochemischen Gradienten aus der Zelle an die Epitheloberfläche strömen. Dies sorgt für eine erhöhte Salzkonzentration in den Sekreten an den jeweiligen Epitheloberflächen, was diese hygroskopisch macht. Dieser Prozess sorgt für wasserreiche, dünnflüssige und leicht zu transportierende Sekrete, was physiologisch wichtig ist. Fällt der durch das *CFTR*-Gen kodierte Ionenkanal in seiner Funktion aus, gibt es keinen Fluss von Chloridionen aus den Epithelzellen und in weiterer Folge kommt es zur Eindickung der Sekrete. Dies betrifft u.a. die Lumen der Lunge, des Darms und der Geschlechtsorgane. Der genaue Mechanismus, der zur Vas Deferens Aplasie führt, ist derzeit nicht bekannt.

Es sind zahlreiche pathogene Mutationen im *CFTR*-Gen bekannt. Die unter Kaukasiern Häufigste ist eine Deletion dreier Basen, die zur Deletion der Aminosäure Phenylalanin an Position 507 führt (bekannt als $\Delta F508$). Sie tritt mit einer Heterozygotenfrequenz von ca 1/20 auf. Das American College of Medical Genetics empfiehlt die Testung von mindestens 23 pathogenen Varianten (ZITAT). Da betroffene Männer grundsätzlich Spermien produzieren, ist eine Gewinnung mittels Punktion zur in vitro Fertilisation möglich. Da es sich bei der Cystischen Fibrose um eine schwerwiegende Erkrankung handelt, empfiehlt sich bei solchen Fällen den Trägerstatus der Frau, bzw. der der resultierenden Feten zu untersuchen (Thirumavalavan N et al, 2019).

1.2.5.2 Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Mangel

Genetisch bedingter Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Mangel ist eine weitere monogene Veränderung, die mit unerfülltem Kinderwunsch einhergeht. Hierbei

kann es zu rekurrenten Fehlgeburten, Präeklampsie und schwerwiegenden fetalen Fehlbildungen wie z.B. zu einer Spina Bifida kommen. Ursächlich ist das in der Region p36.22 des Chromosoms 1 gelegene Gen *MTHFR*. Das codierte Enzym ist wichtig für die Synthese der Aminosäure Methionin. Es sind mehrere pathogene Mutationen bekannt, die häufigste ist der Austausch eines Cysteins zu einem Thymin an Nukleotidposition 677 des kodierenden Bereichs. Dies führt zum Einbau der Aminosäure Valin anstelle eines Alanins, was die Stabilität des entstehenden Enzyms negativ beeinflusst. Mutationen des Gens haben eine autosomal rezessive Wirkung. Weiters dürfte auch eine Hypermethylierung der Promotorregion des *MTHFR* Gens zu einer verminderten Expression des Gens und somit zu verminderten Methylierungs-Reaktionen führen (Liew SC et al, 2015).

Im Zuge der Methioninsynthese wird Homocystein gebildet, das mittels *MTHFR* unter Zuhilfenahme der Vitamine B6, B12, sowie Folsäure abgebaut wird. Mutationen des *MTHFR* Gens können die Enzymaktivität reduzieren und zu einer Homocysteinämie führen, wenn ein Mangel an den genannten Vitaminen vorliegt (Liew SC et al, 2015). Dies kann zu den erwähnten Fertilitätsstörungen führen. Weiters besteht ein Zusammenhang zwischen der Homocysteinämie und thrombotischen Ereignissen insbesondere während der Schwangerschaft. Eine prophylaktische Substitutionstherapie bei Kinderwunsch bzw. während der Schwangerschaft kann diese Risiken jedoch meist gut ausgleichen.

Neben der beschriebenen Wirkungsweise, die die werdende Mutter betrifft, wurde auch ein möglicher Einfluss auf die Spermienbildung beschrieben. Hierbei kommt es zu einer Störung von enzymatischen Vorgängen in der Spermatogenese, welche mit einer Mutation des *MTHFR*-Gens in Zusammenhang gebracht werden können (Cornet D et al, 2017; Ménéz Y et al 2021).

1.2.5.3 Primäre Ziliäre Dyskinesie

Bei der Primären Ziliären Dyskinesie findet man aufgrund von Mutationen in Genen, die für Proteine codieren, welche für die Struktur, Bildung und Funktion der motilen Zilien wichtig sind, eine Fehlfunktion derer. Die Defekte betreffen teilweise die Zilien Motilität im Ductus Deferens in den Hoden oder Spermatozoenstrukturen, welche zu

verringertes Spermienzahl oder Reifungsstörung der Spermien führen kann (Leigh MW et al, 2009). Dies führt zu einer verminderten Anzahl von funktionstüchtigen Spermien. Auch bei Frauen dürfte die Dysfunktion der Cilien an den Tuben, durch verminderte Transportfunktion in den Tuben zur Einschränkung der Fertilität führen. Hier kann man verschiedene Formen der Zilien Dysfunktion unterscheiden, wobei nur bestimmte Organsysteme, zum Beispiel nur die Lungen oder nur die Geschlechtsorgane, isoliert betroffen sind.

Verschiedene Störungen der Spermienbildung können bei der Primären Ziliären Dyskinesie beschrieben werden. Die Azoospermie beschreibt ein vollkommenes Fehlen der Spermien. Bei der Teratospermie und der Globospermie findet man fehlgebildete Spermien. Die Oligospermie beschreibt eine verminderte Anzahl an Spermien und die Asthenospermie beschreibt die fehlerhafte Motilität der Spermien. Diese Phänomene dürften einerseits wegen des falschen Aufbaus der Zilien und andererseits wegen der eingeschränkten Enzymaktivität an den Zilien auftreten (Afzelius BA et al, 1983; Newman L et al 2023). Hierbei sind mehrere Gene betroffen, die zu einer Fehlbildung der Motorproteine an den Dyneinarmen führen (Leigh MW et al, 2009).

Bei einer Mutation des Gens *DNAH17*, zum Beispiel, ist durch eine gestörte ATPase Aktivität die Zilien- oder Flagellen- Bewegung beeinträchtigt. Dadurch entsteht eine verminderte Motilität der Spermien, jedoch findet man interessanterweise keine respiratorischen Symptome (Whitfield M et al, 2019). Die isolierte Veränderung an Organsystemen lässt sich dadurch erklären, dass nicht alle Gene in beweglichen Zilien benötigt werden. So kann es bei manchen Frauen und Männern zu isolierter Subfertilität kommen und bei anderen Betroffenen können die Lungensymptome überwiegen.

1.2.6 Störungen in der Meiose

Ein wichtiger Prozess in der Spermatogenese ist die Meiose. Diese lässt sich in Meiose I und Meiose II unterteilen. Zunächst erfolgt eine Verdopplung der genomischen DNA und damit des Chromosomensatzes. Die Meiose I zeichnet sich vor allem durch die Rekombination der Chromosomen aus. Zu diesem Zeitpunkt

können durch „Crossing Over“ Teilabschnitte ausgetauscht werden, wodurch neue genetische Kombinationen entstehen. Danach werden die Chromosomenpaare getrennt und an die Tochterkerne weitergegeben. Durch die zufällige Verteilung entstehen zwei genetisch verschiedene Tochterkerne. In der Meiose II werden nun die Chromatiden voneinander getrennt. Dadurch entstehen schließlich insgesamt vier haploide Kerne, die rekombiniertes mütterliches beziehungsweise väterliches Erbgut enthalten. Bei diesem komplexen Prozess kommt es zu einem engen Zusammenspiel von vielen Faktoren, wie zum Beispiel der SMAD3 Proteine, welche wichtige Mediatoren für den Transforming-Growth-Factor Beta sind oder Produkte der *SOD3*-Gene, welche wichtige Funktionen bei Redox Reaktionen haben. (Zhu Z et al, 2016). Spermien enthalten viele ungesättigte Fettsäuren, die anfällig sind für Oxidation und bei DNA-Schädigung durch diese, apoptotisch werden (Zhu Z et al, 2016). Daher können exzessive Eliminationsreaktionen zu männlicher Infertilität führen.

Weitere wichtige Regulatoren in der Meiose sind Gene der *HOX*-Familie. Diese Genfamilie spielt eine große Rolle bei der Entwicklung der Extremitäten und der neuronalen Entwicklung, wird aber auch zum Teil in Spermatozyten exprimiert (Zhu Z et al, 2016). Zum Beispiel zeigt das Homeobox Gen *PEM*, welches ursprünglich in Tumorzellen gefunden wurde, selektive Expression im Gewebe der Reproduktionssysteme beider Geschlechter. Nach der Geburt sammeln sich Transkripte des Pem Gens im Nebenhoden (Lindsey S et al, 1996). *HOX*-Gene sind auch wichtig für die Entwicklung des Uterus und die optimale Funktion im Erwachsenenalter. Hier ist besonders *HOXA10* zu erwähnen, welches in den Zellen des Endometriums exprimiert wird und zyklischen Regelungen der ovariellen Steroidhormone unterliegt. Während der embryonalen Implantation wird *HOXA10* vermehrt in den Stromazellen des Endometriums exprimiert. Durch Signale vom Embryo wird die Umwandlung von Stromazellen in Dezidua Zellen aktiviert. Sobald dieser Prozess initialisiert ist, kommt es zu einer raschen Herabregulation von *HOXA10*. Wahrscheinlich ist die Expression von *HOXA10* bei Krankheiten, die das Endometrium betreffen, wie zum Beispiel Endometriose oder Endometriumkarzinom, gestört (Ashary N et al, 2020).

2.0 Genetische Untersuchungsmethoden

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, sind die genetischen Ursachen von Fertilitätsstörungen breit gestreut. Ihnen können numerische Chromosomenaberrationen, strukturelle Veränderungen der Chromosomen und Sequenzmutationen der DNA zugrunde liegen. Konsequenterweise muss eine vollständige genetische Untersuchung alle möglichen Ursachen abdecken. Derzeit ist keine einzelne Testmethode verfügbar, die dazu in der Lage ist. Allerdings kann das volle Spektrum mit einer Kombination aus mehreren Methoden abgedeckt werden, die im Folgenden beschrieben werden.

2.1 Karyotypisierung

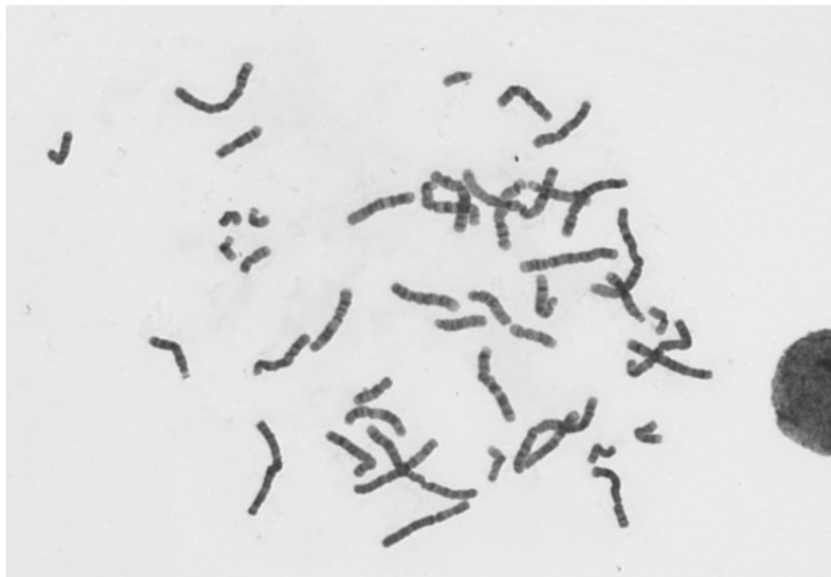


Abb 4: Chromosomen einer in Metaphase befindlichen Zelle, gefärbt mit Giemsa-Trypsin.

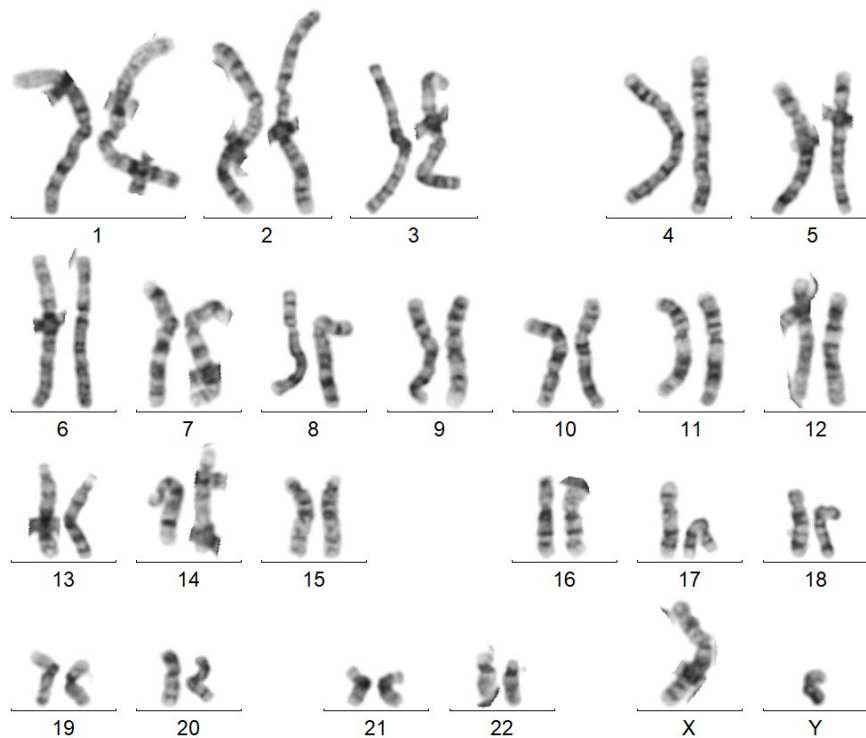


Abb 5: Karyogramm der Metaphase aus Abb 4. Die Giemsa-Trypsin gefärbten Chromosomen der männlichen Metaphase haben eine Bandenauflösung von ca. 550.

Die Chromosomenanalyse gehört zu den ältesten genetischen Untersuchungsmethoden und ist nach wie vor die einzige, mit der ein Chromosom zur Gänze dargestellt werden kann. Dazu müssen die Chromosomen von Zellen untersucht werden, die sich im Stadium der Metaphase befinden. Die DNA in der Metaphase ist stark kondensiert und so können die Chromosomen als optisch voneinander abgrenzbare Entitäten mit einem Lichtmikroskop wahrgenommen werden. Die Metaphase ist eine Periode des Zellteilungszyklus nach der Verdoppelung der DNA und findet also nur bei in Teilung inbegriffenen Zellen statt. In Chromosomen der Metaphase sind in der Äquatorialebene angeordnet und stehen kurz davor, in der darauffolgenden Anaphase auf die Tochterzellen aufgeteilt zu werden. Die stark kondensierten Chromosomen bestehen aus Proteinen, die die DNA unter anderem kompakt halten und mechanisch schützen. Diese DNA-Protein-Komplexe können als „Chromosomen“ identifizierbar gemacht werden.

Im Vergleich dazu sind Zellen, die sich nicht in Stadium der Teilung befinden, in der Interphase. In dieser ist die DNA in einem dekondensierten Zustand: sie ist, obwohl ebenfalls mit zahlreichen Proteinen assoziiert, aufgelockert und so frei zugänglich

für die Prozesse der Genexpression. Die DNA ist daher nicht als Chromosom erkennbar.

Für diese Untersuchung wird eine Probe peripheren, venösen Blutes gewonnen. Da die Zellen, wie beschrieben, in Teilung sein müssen, was kernhaltige Blutzellen (in der Regel Lymphozyten) nicht sind, muss die Blutprobe kultiviert werden. Die Lymphozyten werden dazu mit Phytohämagglutinin zum Wachstum angeregt. Nach mehreren Tagen des Wachstums wird durch den Einsatz von Substanzen, die den Spindelapparat der Metaphase zerstören, wie zum Beispiel Colcemid, verhindert, dass die Chromosomen in der Anaphase separiert werden. Auf diese Weise werden die Zellen künstlich im Zustand der Metaphase gehalten und so ihre Ausbeute erhöht.

Nun wird das Wachstumsmedium entfernt und durch das Hinzufügen von hypotoner Kaliumchlorid Lösung die kernhaltigen Lymphozyten aufgebläht. Die Zellen können nun mit Methanol und Eisessig fixiert werden. Dieser Prozess stabilisiert die Protein-DNA-Komplexe der Chromosomen und macht sie für die folgenden Schritte widerstandsfähiger. Danach wird die Suspension aus Fixierungslösung und Zellen auf einen Objektträger getropft, wodurch die Zellen aufplatzen und die kondensierten Chromosomen aus der Zelle freigesetzt werden. Ziel dabei ist, dass sich die Chromosomen auf dem Objektträger gut genug verteilen, um möglichst nicht übereinander zu liegen zu kommen, und nahe genug zusammenbleiben, um als zusammengehörige Metaphase identifizierbar zu bleiben (siehe Abb 4). Das charakteristische Bandenmuster der Chromosomen kann durch unterschiedliche Prozesse hergestellt werden. Eine gängige Methode ist die Behandlung der Chromosomen mit dem Enzym Trypsin und der nachfolgenden Färbung mit dem Farbstoff Giemsa. Das daraus resultierende Bandenmuster erleichtert die Identifikation der einzelnen Chromosomen und ist essenziell beim Erkennen von strukturellen Veränderungen wie Translokationen oder Inversionen. So können aus dem Bild einer Metaphase die Chromosomen zu einem sogenannten Karyogramm geordnet werden (siehe Abb 5). In dieser Darstellung können überzählige oder fehlende Chromosomen, sowie strukturelle Veränderungen leichter erkannt werden. Normalerweise werden 10 bis 30 Metaphasen eines Patienten/einer Patientin untersucht. Dies erlaubt auch die Erkennung von Veränderungen im Mosaik, also

Veränderungen, die nicht alle Zellen des Körpers betreffen, sofern entsprechende kernhaltige Zellen im Blut vorkommen.

Die erreichte Auflösung wird in der Anzahl an optisch sichtbaren Banden angegeben (die Bandenauflösung) und sollte bei Personen mit gestörter Fertilität 550 betragen. Sie kann jedoch stark schwanken und ist vom Alter der Blutprobe, sowie subtilen Details bei der Chromosomenpräparation (wie den genauen Inkubationszeiten, Lösungskonzentrationen, etc.) genauso abhängig, sowie vom optimalen Zeitpunkt der Ernte der Zellen. Letzterer Punkt liegt an den in der Metaphase zunehmend kompakter werdenden Form der Chromosomen (siehe Abb 6).

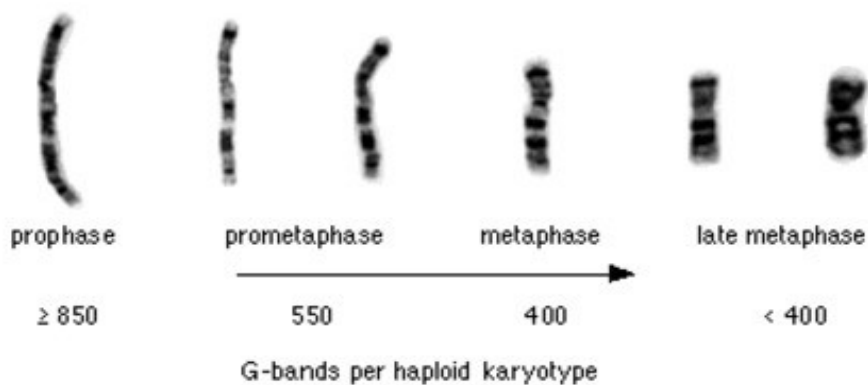


Abb 6: Beispielhafte Darstellung eines Chromosoms 7 zu unterschiedlichen Aufarbeitungszeitpunkten. Während in der Prometaphase noch eine Bandenauflösung von über 850 erzielt werden kann, sind in der späten Metaphase durch die fortgeschrittene Kondensation der Chromosomen nur noch geringe Bandenauflösungen möglich.⁴

Zusammenfassend kann mittels Chromosomenanalyse jede Art der numerischen und strukturellen Chromosomenstörung erkannt werden. Auch die oben bereits erwähnte Robertson'sche Translokation kann durch eine Chromosomenanalyse gut erkannt werden, während andere Techniken wie Microarray, Next Generation Sequencing (NGS) oder Optical Genome Mapping (OGM) dies nicht erlauben. Außerdem ist insbesondere die Detektion von Mosaiken mit den meisten anderen Untersuchungsmethoden nicht mit der Aussagekraft möglich, die eine

⁴ CP Human Genetics, Volume: 45, Issue: 1, Pages: 4.1.1-4.1.19, First published: 15 May 2005, DOI: (10.1002/0471142905.hg0401s45); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von John Wiley & Sons Books

Chromosomenanalyse zulässt. Die niedrigen Kosten der Chromosomenanalyse ist mit ein Grund, warum sie neben der FISH-Analyse die einzige hier vorgestellte Methode ist, die derzeit von den österreichischen Krankenkassen bei isolierter Infertilität finanziert wird.

Die Nachteile der Chromosomenanalyse sind die im Vergleich zu molekularen Techniken schlechte Auflösung. Mittels Chromosomenanalyse können routinemäßig nur Veränderungen von 5-10 Mbp Größe identifiziert werden. Sollten Bereiche mit ähnlichen Bandenmustern betroffen sein, können sogar wesentlich größere Veränderungen übersehen werden, insbesondere, wenn sie balanciert vorliegen.

2.2 FISH-Analyse (Fluoreszenz in situ Hybridisierung)

Die FISH-Analyse ist eine gute Ergänzung zur Chromosomenanalyse mit GTG-Bänderung. Hierbei können wesentlich kleinere Bereiche beobachtet und lokalisiert werden. Als Ausgangsmaterial dienen auf einen Objektträger aufgetropfte Chromosomenpräparate, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Allerdings wird zur Identifikation von fallspezifischen Regionen nicht das Bandenmuster einer Färbung herangezogen, sondern synthetisch hergestellte DNA-Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Aufgrund der Verwendung dieser Sonden zählt die FISH-Analyse zu den molekularzytogenetischen Methoden. Die DNA-Sonden können die zu ihrer Sequenz komplementären Abschnitte an der DNA der fixierten Chromosomen finden und in einem als Hybridisierung bezeichneten Prozess spezifisch binden. Der über die Sonde indirekt am gesuchten DNA-Abschnitt des Chromosoms ebenfalls gebundene Fluoreszenzfarbstoff kann nun mittels Fluoreszenzmikroskop an den (mit dem Farbstoff DAPI eingefärbten) Chromosomen geortet werden. So können wesentlich kleinere Veränderungen als mittels Chromosomenanalyse und GTG-Bänderung sichtbar gemacht werden.

Die Vorteile der Untersuchung sind neben geringen Kosten eine gute Auflösung von strukturellen Veränderungen, wenn auch die im Anschluss beschriebenen Methoden eine bessere Auflösung aufweisen.

Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass der zu untersuchende Abschnitt bereits bekannt sein muss. Eine Untersuchung ohne vorhergehenden Hinweis auf die zu erwartende Veränderung ist damit nicht möglich.

2.3. Microarray

Als Microarray wird eine Untersuchungsmethode bezeichnet, bei denen fluoreszenzmarkierte genomische DNA auf einem Objektträger mit daran fixierten DNA-Sonden aufgetragen und hybridisiert werden (siehe Abb 7). Es wird dabei genomische DNA, die vom zu untersuchenden Patienten stammt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (in der Abbildung wird der Farbstoff Cy5 verwendet und rot dargestellt). Zusätzlich wird auch DNA von einer Vergleichsperson desselben Geschlechts als Referenz mit einem anderen, unterscheidbaren Farbstoff markiert (in der Abbildung: Cy3, grün). Die beiden DNA-Proben werden gemischt und auf den Objektträger aufgetragen, um dort Gelegenheit zu haben, mit den darauf fixierten Sonden hybridisieren zu können. DNA-Moleküle des Patienten und der Referenz stehen nun im Wettbewerb um die spezifisch an sie bindenden Sonden. Eine z.B. beim Patienten vorliegende Duplikation eines Abschnitts führt zu einer Überrepräsentation von DNA-Molekülen aus dieser Region. Dies spiegelt sich in einer entsprechenden Überrepräsentation von vom Patienten stammenden, durch die DNA-Moleküle indirekt an die Sonden bindenden roten Cy5-Farbstoff wider. Diese Verschiebung von (grüner) Referenz zu (rotem) Patient weist auf die Duplikation hin, allerdings ohne das dupliziert vorliegende Material im Genom lokalisieren zu können. Auf diese Weise können Zugewinne und Verluste von genomischem Material des Patienten relativ zum Vergleichsprobanden dargestellt werden. Daher wird diese Form der Microarray-Analyse auch CGH-Array (Comparative Genomic Hybridization) genannt.

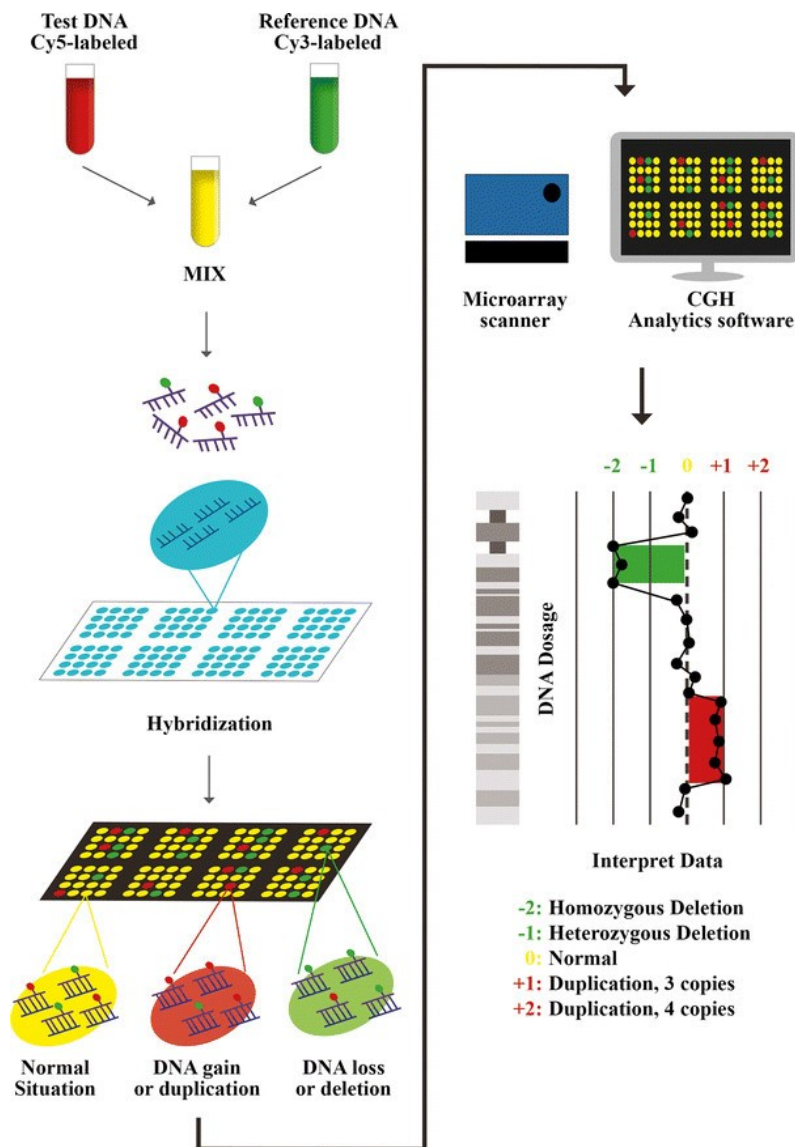


Abb 7: Darstellung der Arbeitsschritte einer Array-CGH Analyse. DNA eines Patienten/einer Patientin wird fragmentiert und fluoreszenzmarkiert (in Rot, Test DNA, Cy5-labeled). Mit der DNA eines Kontrollpatienten oder -Kollektivs wird ebenso verfahren, allerdings wird ein anderer Farbstoff verwendet (in grün, Reference-DNA Cy3-labeled). Die kompetitive Hybridisierung der DNA-Moleküle vom Patienten und Referenz an Sonden auf einem Objektträger können aufgrund der verwendeten Farben unterschieden werden. Letztlich führt dies zur Darstellung genomischer Zugewinne und Verluste der Patienten-DNA in Relation zur Referenz-DNA⁵

Im Vergleich zur Chromosomenanalyse bietet der Microarray eine wesentlich höhere Auflösung. Die genaue Auflösung hängt vom verwendeten Microarray ab: Die kommerziell angebotenen Microarrays unterscheiden sich in der Anzahl der verwendeten Sonden (von aktuell 60.000 bis zu 2.000.000 Sonden). Auch die

⁵ Colaianni et al. 2016. Copy number variations and stroke. Neurological Sciences. 37. 10.1007/s10072-016-2658-y. mit der Creative Commons Lizenz

genomische Position der Sonden ist herstellerspezifisch und kann entweder gleichmäßig auf das Genom verteilt sein, oder in klinisch relevanten Regionen konzentriert werden. Im Idealfall kann so eine Auflösung von ca. 100 bp erreicht werden.

Die Indikation findet vor allem Anwendung bei der Untersuchung von postnatal auftretenden syndromalen Erkrankungen (u.a. geistigen Entwicklungsstörungen und Erkrankungen des Autismus Formenkreises) und wird auch routinemäßig in der Pränataldiagnostik eingesetzt. Darüber hinaus wurde er auch erfolgreich zur Untersuchung von Ursachen von Infertilität eingesetzt (Song SH et al, 2012).

Allerdings gibt es mehrere technische Einschränkungen von Microarrays: die verwendeten Sonden sind nicht auf die Detektion von pathogenen Sequenzmutationen ausgelegt. Diese können mittels Microarray daher nicht erfasst werden. Auch können nur Sonden für genomische Bereiche verwendet werden, die ohne störende Homologien einem einzigartigen Bereich am Genom zuordenbar sind. Für Regionen, die stark homologe oder repetitive Sequenzen beinhalten, können keine wirksamen Sonden hergestellt werden. Die entsprechenden Bereiche können im Microarray daher nicht abgedeckt werden. Da die Detektion ausschließlich auf Zugewinne und Verluste beschränkt ist, also auf unbalancierte chromosomale Veränderungen, können balancierte Veränderungen mit dieser Methode nicht beobachtet werden. Numerische Chromosomenaberrationen wie ein Klinefelter- oder Turner-Karyotyp können zwar einfach erkannt werden, wenn sie durchgehend in den Zellen vorhanden oder im hochgradigen Mosaik vorhanden sind. Geringgradige Mosaik können mittels Array-CGH jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Andere Microarray-Methoden wie der SNP-Array können das Problem der Detektion von geringgradigen Mosaiken jedoch abschwächen.

2.4. NGS (Next Generation Sequencing)

NGS oder „Massive Parallel Sequencing“ ist ein Überbegriff für unterschiedliche Sequenzieretechnologien, deren Gemeinsamkeit eine große Menge DNA in kurzer Zeit zu sequenzieren ist und so das gesamte menschliche Genom eines Patienten in klinisch vertretbarer Zeit zu sequenzieren. Im Vergleich hierzu ist die

Sequenzierung nach Sanger nicht nur wesentlich langsamer, sondern hat auch pro sequenzierte Base wesentlich höhere Kosten. Die Sequenzdaten werden mit einem von mehreren, der Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden, virtuellen Referenzgenom verglichen, wodurch Mutationen relativ dazu angezeigt und beurteilt werden können. Grundsätzlich können alle Teile des Genoms sequenziert werden. Entscheidet man sich dazu, gezielt nur bestimmte Bereiche, z.B. nur die kodierenden Anteile des Genoms zu sequenzieren, kann man Zeit und Kosten einsparen. Man kann also das Whole Genome Sequencing vom Whole Exome Sequencing unterscheiden.

Die Länge der sequenzierten Bereiche ist durch die verwendete Technologie nur kurz (<500 bp). Diese Bereiche können für einen direkten Vergleich mit der Referenzsequenz herangezogen werden. Allerdings stellt ihre geringe Größe das Zusammenfügen der Sequenzen zu großen, durchgehenden Bereichen (s.g. „*de novo* assembly“) ein Hindernis dar. Dies ist homologen und repetitiven Bereichen geschuldet, die wesentlich größer als die überspannten 500 bp sind. Verstärkt wird dies durch den Umstand, dass gegenwärtige NGS-Methoden eine DNA-Amplifikation vor der eigentlichen Sequenzierung durchführen. Diese kann nie ohne eine unbeabsichtigte Bevor- bzw. Benachteiligung gewisser Regionen ablaufen.

Um die Auswirkungen von Sequenzierfehlern abzuschwächen, wird jede Region mehrfach sequenziert. Die Sequenziertiefe ist ein Maß dafür, wie oft eine bestimmte Position sequenziert wurde.

Die Suche nach Sequenzunterschieden von der Patienten-DNA zum Referenzgenom läuft automatisch ab und wird „Variant Calling“ genannt. Dies geschieht mit Hilfe von bestimmten Programmen. Durch Vergleich mit Datenbanken, können häufige Varianten, die statistisch gesehen zu häufig vorkommen um eine pathogene Bedeutung zu haben, herausgefiltert werden, während seltene Varianten, die möglicherweise klinisch relevant sein könnten, angezeigt werden (Slatko BE et al, 2018; Church GM et al, 2006; Ravi RK et al, 2008).

Mittels NGS konnte zum Beispiel die genetische Ursache einer primären ziliären Dyskinesie entdeckt werden, wie bereits angesprochen, eine Erkrankung, bei der

es zu einer gestörten Ausbildung von ziliären Strukturen kommt (Thirumavalavan et al, 2019).

Die Einschränkung dieser Methode des NGS liegt in der Erkennung struktureller Veränderungen. Zugewinne und Verluste können noch im beschränkten Umfang aufgrund der Quantifizierung von eindeutig zuordenbaren Regionen festgestellt werden, obwohl eine vorangegangene, ungleichmäßige Amplifikation eine Hürde darstellt. Balancierte Veränderungen können jedoch aufgrund der geringen Länge der sequenzierten Moleküle oft nicht erkannt werden.

Zusammenfassend eignet sich die Methode gut zur Suche nach mit Infertilität assoziierten Mutationen. Die Anzahl der bekannten Veränderungen wird laufend durch neue Entdeckungen erweitert, sodass diese Methode immer mehr an Bedeutung bei der Diagnose von Ursachen von Fertilitätsstörungen gewinnt.

2.5 Optical Genome Mapping (OGM)

OGM ist eine Methode, die lange, native DNA-Fragmente untersucht. Es existieren aktuell wenige kommerzielle Anbieter, darunter sind Genomic Vision, Nabsys, und Bionano Genomics, der derzeit prominenteste Hersteller. Die Technik der Hersteller unterscheidet sich in Details, jedoch ist ihnen gemein, dass die zu untersuchenden DNA-Moleküle nicht sequenziert werden. Stattdessen werden die Moleküle in einem ersten Schritt sequenzspezifisch mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Die verwendeten Sequenzen sind meist kurz und ubiquitär im zu untersuchenden Genom vorhanden. Bionano Genomics verwendet u.a. die Sequenz CTTAAG, die ca. 15 Mal in 100 kbp des menschlichen Genoms vorkommt. Die Methoden des Markierungsprozesses können unterschiedlich sein. Dabei kommen u.a. Nicking-Enzyme zum Einsatz. Diese führen Einzelstrangbrüche an der DNA ein, die in weiteren Schritten fluoreszenzmarkiert und anschließend repariert werden. Eine weitere, ebenfalls aktuell eingesetzte Methode basiert auf dem direkten Markieren des DNA-Rückgrats mittels eines Fluorophors unter Verwendung einer Methyltransferase. Dadurch wird eine direkte Markierung möglich, ohne den Strang zu beschädigen (Deschamps S et al, 2018). Jede Beschädigung des DNA-Stranges, auch ein Einzelstrangbruch, führt zu im Schnitt kürzeren DNA-

Fragmenten. Die Länge der DNA-Fragmente ist durch die Technik des OGM unbegrenzt und wird gezielt hochgehalten. Die Beschränkung der DNA-Länge sind vielmehr die im Zuge ihrer Verarbeitung auftretenden und unvermeidbaren Scherkräfte, die die ungeschützten DNA-Moleküle ausgesetzt sind. Mit speziellen DNA-Isolationsprotokollen und großer Sorgfalt und Erfahrung sind Moleküllängen von im Schnitt über 300 kbp Länge möglich. Normalerweise in der Routine eingesetzte DNA-Isolationsmethoden erreichen lediglich Fragmentlängen von 20-30 kbp.

Nach der erfolgreichen Isolation der DNA und ihrer Markierung wird die DNA in das Analyseinstrument des entsprechenden Herstellers eingebracht. Allen Methoden gemein ist, dass die DNA durch Mikrofluidik-Kanäle oder -Poren linearisiert und vereinzelt wird. Ziel ist es, die Fluoreszenzmarkierungen und ihre relative Distanz zueinander auf den einzelnen Molekülen zu erfassen. Das ausgelesene Muster ist ähnlich dem eines Strichcodes und kann, wenn es lang genug ist, einer Stelle des menschlichen Genoms eindeutig zugeordnet werden (Müller V et al 2017; Levy-Sakin M et al, 2013). Ein OGM-System liest also die Markierungssequenz eines DNA-Moleküls, die wesentlich niedriger auflösend als die von NGS-Methoden ist. Die geringe Auflösung stellt zwar einen Nachteil dar, allerdings ist derzeit keine Technologie marktreif, die ähnlich lange Moleküle routinemäßig untersuchen kann (Dremsek et al, 2021).

Die durch das Instrument abgelesenen Moleküle und ihre Markierungsmuster werden digitalisiert und als elektronische Repräsentationen weiterverarbeitet. Die hohe Länge der Moleküle erlaubt eine zuverlässige *de novo* Assemblierung unter Verwendung geeigneter Software. Hierbei können durchgehende Molekülkarten erstellt werden, die im Idealfall einen Chromosomenarm zur Gänze abdecken können. Hier liegt der Vorteil dieser Technologie, die damit die meisten im menschlichen Genom vorkommenden repetitiven Sequenzen überspannen kann und somit fast jede Art der strukturellen Chromosomenaberration ab einer Größe von > 30 kbp detektieren und darstellen kann. Die dabei erzielte Auflösung variiert, liegt aber im Bereich einiger Kilobasen und ist damit wesentlich höher als die eines Karyogramms mittels GTG-Bänderung (Dremsek et al, 2021). Im Gegensatz zu Microarray-Analysen können auch balancierte Veränderungen wie Inversionen und Translokationen dargestellt werden (Yuan Y et al, 2020). Zusätzlich kann bei

Zugewinnen das betroffene Material lokalisiert werden. So kann determiniert werden, ob die Veränderungen Gene oder regulatorische Elemente betreffen (Dremsek P et al, 2021). Da strukturelle Veränderungen in repetitiven Regionen vorkommen können, stellen die im Vergleich zu NGS-Methoden wesentlich längeren Moleküle einen möglichen Vorteil bei der Erkennung dar (Lam ET et al, 2012; Jo K et al, 2007).

Unter Zuhilfenahme von OGM konnten mittlerweile genetische Ursachen für Entwicklungsverzögerung, Autismus Spektrum Erkrankungen, Reproduktive Störungen und genetische Malformationen nachgewiesen werden sowie pränatale Untersuchungen durchgeführt werden (Eisfeldt J et al, 2022; Mantere T et al 2021).

Schwierigkeiten von OGM ergeben sich bei der Erkennung von Veränderungen, deren Bruchpunkte in repetitiven Strukturen liegen, die zu groß sind, um mittels OGM überspannt werden zu können. Dazu zählen neben großen segmentalen Duplikationen (wie z.B. am kurzen Arm des Chromosoms 8) insbesondere die Zentromere, sowie die Satellitenregionen von akrozentrischen Chromosomen (Dremsek P et al, 2021).

Darüber hinaus hat OGM weitere, technische Limitationen: Die Offensichtlichste ist die im Vergleich zu Sequenziermethoden deutlich geringere Auflösung aufgrund der weit auseinander liegenden Markierungen. Dies ist notwendig, da die Visualisierung mittels fluoreszierender Farbstoffe durch das Diffraktion-Resolution-Limit keine näher beieinanderliegenden Markierungen auflösen kann: durch die Beugung von Licht können nur Regionen unterschieden werden, die mehr als die Hälfte des emittierten Lichts entfernt sind (ca 250 nm, ca. 800 bp) (Hell SW et al, 1994). Somit wird die optische Auflösung zu einem limitierenden Faktor für die Informationsdichte, die auf dem DNA-Molekül entschlüsselt werden könnte. Jedoch kann das Diffraktion-Resolution-Limit durch stimulierte Emission, um den Fluoreszenz Prozess außerhalb der interessanten Regionen zu verhindern, eingeschränkt werden (Su T et al, 2011). Die Probleme der optischen Detektion versucht der Hersteller Nabsys mit elektronischer an Stelle von optischer Detektion der Markierungen zu umgehen. Der Vorteil einer optischen Erkennung, dass mehrere Farben auf dem Genom eines DNA-Moleküls verwendet werden können, wird aktuell ohnehin von keinem der Anbieter verwendet.

Auch Raumtemperatur beeinflusst das Bewegungsmuster der Moleküle. Die thermale Fluktuation eines internen Segments eines DNA-Moleküls in einem der zur Linearisierung verwendeten Nanokanäle beträgt ca 50-100 nm (Su T et al, 2011). Daraus ergibt sich, dass die Genauigkeit der Messung stark von der Umgebungstemperatur abhängig ist und der Ausrichtung der DNA, welche nicht immer eindeutig linear zu liegen kommt. Dies limitiert die Auflösung, da zwei beieinander liegende Marker schwer lokalisiert werden können und die korrekte Zuordnung eines Markers anhand der Lokalisation auf dem Bild erschwert ist (Su T et al, 2011; Jeffet J et al, 2016). Thermale Fluktuation kann mittels Foto-Bleaching zu einem Teil umgangen werden (Jeffet J et al, 2016).

3.0 Diskussion

Die Karyotypisierung und FISH-Analyse sind nach wie vor die Untersuchungsmethoden der Wahl bei Infertilität und rekurrenten Aborten, wenn eine Analyse von Chromosomenveränderungen kostengünstig und relativ schnell erfolgen soll. Mit diesen Methoden können sowohl balancierte als auch unbalancierte Veränderungen untersucht werden, da sie vor allem durch die Möglichkeit Chromosomen als Ganzes darzustellen hervorstechen.

Die Limitierung der genannten Methoden liegt in der Auflösung. Mit der Karyotypisierung können Regionen von 5-10 Mb analysiert werden. Eine genaue Erfassung von Genen innerhalb der Abschnitte ist jedoch nicht möglich. Eine gute Ergänzung bieten Array basierte Untersuchungsmethoden und das Optical Genome Mapping, da durch sie die Möglichkeit entsteht, kleinere strukturelle Veränderungen zu analysieren und eine bessere Auflösung zu erreichen. Dadurch erlangt man deutlich mehr Information über das zu untersuchende Chromosom (Dai P et al, 2022). Lange Abschnitte und vor allem die Kontinuität im Falle von repetitiven Sequenzen können also mittels OGM gut dargestellt werden (Savara J et al, 2021).

Eine Limitierung der Methode liegt aufgrund der immer noch zu geringen Moleküllänge bei der Analyse von Telomer- und Zentromer- Regionen. So können Robertson'sche Translokationen, deren Ausschluss für Fertilitätsstörungen essenziell sind, zum Beispiel, nicht erkannt werden. Bei der Untersuchung von

Einzel-Gen Veränderungen ist nach wie vor das WES oder WGS unübertroffen. Diese könnte auch bei der Diagnostik der Infertilität wichtig werden, da die Anzahl der damit assoziierten Gene stetig wächst. Doch auch hier könnte OGM eine gute Ergänzung bieten, da die Veränderungen im strukturellen Zusammenhang betrachtet werden können.

In der Gesamtheit hat jede Untersuchung ihre Vorteile und sie decken die gegebenen Lücken gegenseitig ab. Daraus folgt, dass jede Untersuchung ihre Wichtigkeit in der Untersuchung der Infertilität hat.

Literatur

1. https://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/bevoelkerung/index.html, abgerufen am 28.12.2021
2. Female age related fertilitx decline . Committee Opinion No. 589, American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice and Practice Committee, PMID: 24559617, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.032
3. Uterine septum: a guideline, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Collaborators expand, Fertil Steril, 2016 Sep 1;106(3):530-40. Doi:10.1016/j.fertnstert.2016.05.014. Epub 2016 May 25, PMID:27235766
4. Menon S, Timms P, Allan JA, Alexander K, Rombauts L, Horner P, Keltz M, Hocking J, Huston WM. Human and Pathogen Factors Associated with Chlamydia trachomatis-Related Infertility in Women. Clin Microbiol Rev. 2015 Oct;28(4):969-85. doi: 10.1128/CMR.00035-15. PMID: 26310245; PMCID: PMC4548260
5. Motrich RD, Salazar FC, Bresler ML, Mackern-Oberti JP, Godoy GJ, Olivera C, Paira DA, Rivero VE. Implications of prostate inflammation on male fertility. Andrologia. 2018 Dec;50(11):e13093. doi: 10.1111/and.13093. PMID: 30569650.
6. Arnemann J, Schnittger S, Hinkel GK, Tolkendorf E, Schmidtke J, Hansmann I. A sterile male with 45,X0 and a Y;22 translocation. Hum Genet. 1991 Jun;87(2):134-8. doi: 10.1007/BF00204168. PMID: 2066100.
7. Marsh CA, Auchus RJ. Fertility in patients with genetic deficiencies of cytochrome P450c17 (CYP17A1): combined 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency and isolated 17,20-lyase deficiency. Fertil Steril. 2014 Feb;101(2):317-22. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.011. PMID: 24485502.
8. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Genetic-Mapping-Fact-Sheet>, abgerufen am 22.05.2021)
9. Where are we going with gene screening in male infertility, Nannan Thirumavalavan, M.D., J. Scott Gabrielsen, M.D., Ph.D., and Dolores J. Lamb, Ph.D., H.C.L.D. Scott Department of Urology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas; and Department of Urology, Center for Reproductive Genomics and Caryle and Israel Englander, Institute for Precision Medicine, Weill Cornell School of Medicine, New York, New York , Fertil Steril 2019;111:842–50. 2019 by American Society for Reproductive Medicine.).
10. Dremsek,P.;Schwarz,T.; Weil, B.; Malashka, A.; Laccone, F.; Neesen, J. Optical Genome Mapping in Routine Human Genetic Diagnostics—Its Advantages and Limitations. *Genes* **2021**, *12*, 1958. <https://doi.org/10.3390/genes12121958>
11. Levy B, Burnside RD. Are all chromosome microarrays the same? What clinicians need to know. Prenat Diagn. 2019 Feb;39(3):157-164. doi: 10.1002/pd.5422. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30673135.
12. Eisfeldt J, Schuy J, Stattin EL, Kvarnung M, Falk A, Feuk L, Lindstrand A. Multi-Omic Investigations of a 17-19 Translocation Links *MINK1* Disruption to Autism, Epilepsy and Osteoporosis. Int J Mol Sci. 2022 Aug 20;23(16):9392. doi: 10.3390/ijms23169392. PMID: 36012658; PMCID: PMC9408972.
13. Jo K, Dhingra DM, Odijk T, de Pablo JJ, Graham MD, Runnheim R, Forrest D, Schwartz DC. A single-molecule barcoding system using nanoslits for DNA analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 20;104(8):2673-8. doi: 10.1073/pnas.0611151104. Epub 2007 Feb 12. PMID: 17296933; PMCID: PMC1815240.
14. Jo K, Dhingra DM, Odijk T, de Pablo JJ, Graham MD, Runnheim R, Forrest D, Schwartz DC. A single-molecule barcoding system using nanoslits for DNA analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 20;104(8):2673-8. doi: 10.1073/pnas.0611151104. Epub 2007 Feb 12. PMID: 17296933; PMCID: PMC1815240.

15. Levy-Sakin M, Ebenstein Y. Beyond sequencing: optical mapping of DNA in the age of nanotechnology and nanoscopy. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;Aug;24(4):690-8. doi: 10.1016/j.copbio.2013.01.009. Epub 2013 Feb 18. PMID: 23428595.
16. Müller V, Westerlund F. Optical DNA mapping in nanofluidic devices: principles and applications. *Lab Chip.* 2017 Feb 14;17(4):579-590. doi: 10.1039/c6lc01439a. PMID: 28098301.
17. Müller V, Dvirnas A, Andersson J, Singh V, Kk S, Johansson P, Ebenstein Y, Ambjörnsson T, Westerlund F. Enzyme-free optical DNA mapping of the human genome using competitive binding. *Nucleic Acids Res.* 2019 Sep 5;47(15):e89. doi: 10.1093/nar/gkz489. PMID: 31165870; PMCID: PMC6735870.
18. Deschamps S, Zhang Y, Llaca V, Ye L, Sanyal A, King M, May G, Lin H. A chromosome-scale assembly of the sorghum genome using nanopore sequencing and optical mapping. *Nat Commun.* 2018 Nov 19;9(1):4844. doi: 10.1038/s41467-018-07271-1. PMID: 30451840; PMCID: PMC6242865.
19. Yuan Y, Chung CY, Chan TF. Advances in optical mapping for genomic research. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020 Aug 1;18:2051-2062. doi: 10.1016/j.csbj.2020.07.018. PMID: 32802277; PMCID: PMC7419273.
20. Su T, Das SK, Xiao M, Purohit PK. Transition between two regimes describing internal fluctuation of DNA in a nanochannel. *PLoS One.* 2011 Mar 15;6(3):e16890. doi: 10.1371/journal.pone.0016890. PMID: 21423606; PMCID: PMC3057976.
21. Jeffet J, Kobo A, Su T, Grunwald A, Green O, Nilsson AN, Eisenberg E, Ambjörnsson T, Westerlund F, Weinhold E, Shabat D, Purohit PK, Ebenstein Y. Super-Resolution Genome Mapping in Silicon Nanochannels. *ACS Nano.* 2016 Nov 22;10(11):9823-9830. doi: 10.1021/acsnano.6b05398. Epub 2016 Sep 23. PMID: 27646634.
22. Müller V, Dvirnas A, Andersson J, Singh V, Kk S, Johansson P, Ebenstein Y, Ambjörnsson T, Westerlund F. Enzyme-free optical DNA mapping of the human genome using competitive binding. *Nucleic Acids Res.* 2019 Sep 5;47(15):e89. doi: 10.1093/nar/gkz489. PMID: 31165870; PMCID: PMC6735870.
23. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018 Apr;122(1):e59. doi: 10.1002/cpmb.59. PMID: 29851291; PMCID: PMC6020069.
24. Church GM. Genomes for all. *Sci Am.* 2006 Jan;294(1):46-54. doi: 10.1038/scientificamerican0106-46. PMID: 16468433.
25. Morris JK, Alberman E, Scott C, Jacobs P. Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *Eur J Hum Genet.* 2008 Feb;16(2):163-70. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201956. Epub 2007 Nov 14. PMID: 18000523.
26. Thirumavalavan N, Gabrielsen JS, Lamb DJ. Where are we going with gene screening for male infertility? *Fertil Steril.* 2019 May;111(5):842-850. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.036. PMID: 31029238.
27. Whitfield M, Thomas L, Bequignon E, Schmitt A, Stouvenel L, Montantin G, Tissier S, Duquesnoy P, Copin B, Chantot S, Dastot F, Faucon C, Barbotin AL, Loyens A, Siffroi JP, Papon JF, Escudier E, Amselem S, Mitchell V, Touré A, Legendre M. Mutations in DNAH17, Encoding a Sperm-Specific Axonemal Outer Dynein Arm Heavy Chain, Cause Isolated Male Infertility Due to Asthenozoospermia. *Am J Hum Genet.* 2019 Jul 3;105(1):198-212. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.04.015. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31178125; PMCID: PMC6612517.
28. Lindsey S, Wilkinson MF. Homeobox genes and male reproductive development. *J Assist Reprod Genet.* 1996 Feb;13(2):182-92. doi: 10.1007/BF02072542. PMID: 8688593.
29. Ashary N, Laheri S, Modi D. Homeobox genes in endometrium: from development to decidualization. *Int J Dev Biol.* 2020;64(1-2-3):227-237. doi: 10.1387/ijdb.190120dm. PMID: 32659011.

30. Wilczyńska K, Radwan P, Krasiński R, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Barcz E, Nowak I. KIR and HLA-C genes in male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2020 Aug;37(8):2007-2017. doi: 10.1007/s10815-020-01814-6. Epub 2020 May 20. PMID: 32436047; PMCID: PMC7467998.
31. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet.* 2015 Jan;58(1):1-10. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.10.004. Epub 2014 Nov 4. PMID: 25449138.
32. Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, Knowles MR, Zariwala MA. Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genet Med.* 2009 Jul;11(7):473-87. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181a53562. PMID: 19606528; PMCID: PMC3739704.
33. Savara J, Novosád T, Gajdoš P, Kriegová E. Comparison of structural variants detected by optical mapping with long-read next-generation sequencing. *Bioinformatics.* 2021 May 13;btab359. doi: 10.1093/bioinformatics/btab359. Epub ahead of print. PMID: 33983367.
34. Dai P, Zhu X, Pei Y, Chen P, Li J, Gao Z, Liang Y, Kong X. Evaluation of optical genome mapping for detecting chromosomal translocation in clinical cytogenetics. *Mol Genet Genomic Med.* 2022 Jun;10(6):e1936. doi: 10.1002/mgg3.1936. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35384386; PMCID: PMC9184658.
35. Wilhoit LF, Scott DA, Simecka BA. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Characteristics, Complications, and Treatment. *Community Ment Health J.* 2017 Aug;53(6):711-718. doi: 10.1007/s10597-017-0104-0. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28168434.
36. Abraham M, Alramadhan S, Iniguez C, Duijts L, Jaddoe VW, Den Dekker HT, Crozier S, Godfrey KM, Hindmarsh P, Vik T, Jacobsen GW, Hanke W, Sobala W, Devereux G, Turner S. A systematic review of maternal smoking during pregnancy and fetal measurements with meta-analysis. *PLoS One.* 2017 Feb 23;12(2):e0170946. doi: 10.1371/journal.pone.0170946. PMID: 28231292; PMCID: PMC5322900.
37. Smid MC, Metz TD, Gordon AJ. Stimulant Use in Pregnancy: An Under-recognized Epidemic Among Pregnant Women. *Clin Obstet Gynecol.* 2019 Mar;62(1):168-184. doi: 10.1097/GRF.0000000000000418. PMID: 30601144; PMCID: PMC6438363.
38. Winter AK, Moss WJ. Rubella. *Lancet.* 2022 Apr 2;399(10332):1336-1346. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02691-X. PMID: 35367004.
39. Piekarska K, Radwan P, Tarnowska A, Wiśniewski A, Radwan M, Wilczyński JR, Malinowski A, Nowak I. ERAP, KIR, and HLA-C Profile in Recurrent Implantation Failure. *Front Immunol.* 2021 Oct 22;12:755624. doi: 10.3389/fimmu.2021.755624. PMID: 34745129; PMCID: PMC8569704.
40. Vargas RG, Bompeixe EP, França PP, Marques de Moraes M, da Graça Bicalho M. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor genes' association with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 2009 Jul;62(1):34-43. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00709.x. PMID: 19527230.
41. Alecsandru D, Klimczak AM, Garcia Velasco JA, Pirtea P, Franasiak JM. Immunologic causes and thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2021 Mar;115(3):561-566. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.01.017. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33610320.
42. Masterson TA 3rd, Nassau DE, Ramasamy R. A clinical algorithm for management of fertility in adolescents with the Klinefelter syndrome. *Curr Opin Urol.* 2020 May;30(3):324-327. doi: 10.1097/MOU.0000000000000757. PMID: 32235276.
43. Pook CJ, Cocca A, Grandone A, Al-Hussini M, Lam W. The Evidence for Fertility Preservation in Pediatric Klinefelter Syndrome. *Front Reprod Health.* 2021 Aug 3;3:629179. doi: 10.3389/frph.2021.629179. PMID: 36304035; PMCID: PMC9580826.

44. Sekido R. The potential role of SRY in epigenetic gene regulation during brain sexual differentiation in mammals. *Adv Genet.* 2014;86:135-65. doi: 10.1016/B978-0-12-800222-3.00007-3. PMID: 25172349.
45. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.* 2009 Jan;25(1):19-29. doi: 10.1016/j.tig.2008.10.008. Epub 2008 Nov 20. PMID: 19027189.
46. Wilch ES, Morton CC. Historical and Clinical Perspectives on Chromosomal Translocations. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1044:1-14. doi: 10.1007/978-981-13-0593-1_1. PMID: 29956287.
47. Tunç E, Ilgaz S. Robertsonian translocation (13;14) and its clinical manifestations: a literature review. *Reprod Biomed Online.* 2022 Sep;45(3):563-573. doi: 10.1016/j.rbmo.2022.05.019. Epub 2022 May 29. PMID: 35810081.
48. Antonarakis SE. Short arms of human acrocentric chromosomes and the completion of the human genome sequence. *Genome Res.* 2022 Apr;32(4):599-607. doi: 10.1101/gr.275350.121. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35361624; PMCID: PMC8997349.
49. Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bizkadze AV, Mikheenko A, Vollger MR, Altemose N, Uralsky L, Gershman A, Aganezov S, Hoyt SJ, Diekhans M, Logsdon GA, Alonge M, Antonarakis SE, Borchers M, Bouffard GG, Brooks SY, Caldas GV, Chen NC, Cheng H, Chin CS, Chow W, de Lima LG, Dishuck PC, Durbin R, Dvorkina T, Fiddes IT, Formenti G, Fulton RS, Functammasan A, Garrison E, Grady PGS, Graves-Lindsay TA, Hall IM, Hansen NF, Hartley GA, Haukness M, Howe K, Hunkapiller MW, Jain C, Jain M, Jarvis ED, Kerpedjiev P, Kirsche M, Kolmogorov M, Korlach J, Kremitzki M, Li H, Maduro VV, Marschall T, McCartney AM, McDaniel J, Miller DE, Mullikin JC, Myers EW, Olson ND, Paten B, Peluso P, Pevzner PA, Porubsky D, Potapova T, Rogaev EI, Rosenfeld JA, Salzberg SL, Schneider VA, Sedlazeck FJ, Shafin K, Shew CJ, Shumate A, Sims Y, Smit AFA, Soto DC, Sović I, Storer JM, Streets A, Sullivan BA, Thibaud-Nissen F, Torrance J, Wagner J, Walenz BP, Wenger A, Wood JMD, Xiao C, Yan SM, Young AC, Zarate S, Surti U, McCoy RC, Dennis MY, Alexandrov IA, Gerton JL, O'Neill RJ, Timp W, Zook JM, Schatz MC, Eichler EE, Miga KH, Phillippy AM. The complete sequence of a human genome. *Science.* 2022 Apr;376(6588):44-53. doi: 10.1126/science.abj6987. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35357919; PMCID: PMC9186530.
50. van Niekerk WA. Chromosomes and the gynecologist. *Am J Obstet Gynecol.* 1978 Apr 15;130(8):862-75. doi: 10.1016/0002-9378(78)90263-6. PMID: 345819.
51. Ménéz Y, Patrizio P, Alvarez S, Amar E, Brack M, Brami C, Chouteau J, Clement A, Clement P, Cohen M, Cornet D, Dale B, D' Amato G, Jacquesson-Fournols L, Mares P, Neveux P, Sage JC, Servy E, Huong TM, Viot G. MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase: EC 1.5.1.20) SNPs (single-nucleotide polymorphisms) and homocysteine in patients referred for investigation of fertility. *J Assist Reprod Genet.* 2021 Sep;38(9):2383-2389. doi: 10.1007/s10815-021-02200-6. Epub 2021 Apr 29. PMID: 33914208; PMCID: PMC8490548.
52. Cornet D, Cohen M, Clement A, Amar E, Fournols L, Clement P, Neveux P, Ménéz Y. Association between the MTHFR-C677T isoform and structure of sperm DNA. *J Assist Reprod Genet.* 2017 Oct;34(10):1283-1288. doi: 10.1007/s10815-017-1015-2. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28842818; PMCID: PMC5633564.
53. Afzelius BA, Eliasson R. Male and female infertility problems in the immotile-cilia syndrome. *Eur J Respir Dis Suppl.* 1983;127:144-7. PMID: 6604647.
54. Newman S, et al. Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints. *Am J Hum Genet.* 2015; 96:208–220. [PubMed: 25640679]
55. Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, Knowles MR, Zariwala MA. Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener

- syndrome. *Genet Med.* 2009 Jul;11(7):473-87. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181a53562. PMID: 19606528; PMCID: PMC3739704.
56. Shulman LP. Müllerian anomalies. *Clin Obstet Gynecol.* 2008 Jun;51(2):214-22. doi: 10.1097/GRF.0b013e31816feba0. PMID: 18463453.
 57. Jacquinet A, et al. GREB1L variants in familial and sporadic hereditary urogenital dysplasia and Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Clin Genet.* 2020 Aug;98(2):126-137. doi: 10.1111/cge.13769
 58. Song SH, Shim SH, Bang JK, Park JE, Sung SR, Cha DH. Genome-wide screening of severe male factor infertile patients using BAC-array comparative genomic hybridization (CGH). *Gene.* 2012 Sep 10;506(1):248-52. doi: 10.1016/j.gene.2012.06.030. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22750321.
 59. Bonavina G, Taylor HS. Endometriosis-associated infertility: From pathophysiology to tailored treatment. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Oct 26;13:1020827. doi: 10.3389/fendo.2022.1020827. PMID: 36387918; PMCID: PMC9643365.
 60. Filip L, Duică F, Prădatu A, Crețoiu D, Suciuc N, Crețoiu SM, Predescu DV, Varlas VN, Voinea SC. Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches. *Medicina (Kaunas).* 2020 Sep 9;56(9):460. doi: 10.3390/medicina56090460. PMID: 32916976; PMCID: PMC7559069.
 61. Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. *Methods Mol Biol.* 2018;1706:223-232. doi: 10.1007/978-1-4939-7471-9_12. PMID: 29423801.
 62. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018 Apr;122(1):e59. doi: 10.1002/cpmb.59. PMID: 29851291; PMCID: PMC6020069.
 63. Church GM. Genomes for all. *Sci Am.* 2006 Jan;294(1):46-54. doi: 10.1038/scientificamerican0106-46. PMID: 16468433.
 64. Müller V, Dvirnas A, Andersson J, Singh V, Kk S, Johansson P, Ebenstein Y, Ambjörnsson T, Westerlund F. Enzyme-free optical DNA mapping of the human genome using competitive binding. *Nucleic Acids Res.* 2019 Sep 5;47(15):e89. doi: 10.1093/nar/gkz489. PMID: 31165870; PMCID: PMC6735870.
 65. Levy B, Burnside RD. Are all chromosome microarrays the same? What clinicians need to know. *Prenat Diagn.* 2019 Feb;39(3):157-164. doi: 10.1002/pd.5422. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30673135.
 66. Wilhoit LF, Scott DA, Simecka BA. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Characteristics, Complications, and Treatment. *Community Ment Health J.* 2017 Aug;53(6):711-718. doi: 10.1007/s10597-017-0104-0. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28168434.
 67. Stimpson KM, Sullivan LL, Kuo ME, Sullivan BA. Nucleolar organization, ribosomal DNA array stability, and acrocentric chromosome integrity are linked to telomere function. *PLoS One.* 2014 Mar 24;9(3):e92432. doi: 10.1371/journal.pone.0092432. PMID: 24662969; PMCID: PMC3963894.
 68. Wolff DJ, Schwartz S. Characterization of Robertsonian translocations by using fluorescence in situ hybridization. *Am J Hum Genet.* 1992 Jan;50(1):174-81. PMID: 1729886; PMCID: PMC1682527.
 69. McStay B. The p-Arms of Human Acrocentric Chromosomes Play by a Different Set of Rules. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2022 Feb 28. doi: 10.1146/annurev-genom-101122-081642. Epub ahead of print. PMID: 36854315.
 70. Dinulovic D, Radonjic G. Diabetes mellitus/male infertility. *Arch Androl.* 1990;25(3):277-93. doi: 10.3109/01485019008987617. PMID: 2285351.
 71. Sironen A, Shoemark A, Patel M, Loebinger MR, Mitchison HM. Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Jun;77(11):2029-2048. doi: 10.1007/s00018-019-03389-7. Epub 2019 Nov 28. PMID: 31781811; PMCID: PMC7256033.

72. Reynolds N, Cooke HJ. Role of the DAZ genes in male fertility. *Reprod Biomed Online*. 2005 Jan;10(1):72-80. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60806-1. PMID: 15705297.
73. Fu XF, Cheng SF, Wang LQ, Yin S, De Felici M, Shen W. DAZ Family Proteins, Key Players for Germ Cell Development. *Int J Biol Sci*. 2015 Aug 15;11(10):1226-35. doi: 10.7150/ijbs.11536. PMID: 26327816; PMCID: PMC4551758.
74. Haervig KB, Mortensen LH, Hansen AV, Strandberg-Larsen K. Use of ADHD medication during pregnancy from 1999 to 2010: a Danish register-based study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2014 May;23(5):526-33. doi: 10.1002/pds.3600. Epub 2014 Mar 4. PMID: 24590619.
75. Beaudoin ML, Renaud C, Boucher M, Kakkar F, Gantt S, Boucoiran I. Perspectives of women on screening and prevention of CMV in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021 Mar;258:409-413. doi: 10.1016/j.ejogrb.2021.01.035. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33548895.
76. Jacquinet A, et al. GREB1L variants in familial and sporadic hereditary urogenital adysplasia and Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Clin Genet*. 2020 Aug;98(2):126-137. doi: 10.1111/cge.13769
77. Dinulovic D, Radonjic G. Diabetes mellitus/male infertility. *Arch Androl*. 1990;25(3):277-93. doi: 10.3109/01485019008987617. PMID: 2285351.
78. Fu XF, Cheng SF, Wang LQ, Yin S, De Felici M, Shen W. DAZ Family Proteins, Key Players for Germ Cell Development. *Int J Biol Sci*. 2015 Aug 15;11(10):1226-35. doi: 10.7150/ijbs.11536. PMID: 26327816; PMCID: PMC4551758.
79. Ding A, Guerin A, Lujan ME, Velez MP. Polycystic Ovary Syndrome and Incidental Diagnosis of Mosaic Turner Syndrome. *J Obstet Gynaecol Can*. 2021 Jun;43(6):756-759. doi: 10.1016/j.jogc.2020.08.020. Epub 2020 Sep 8. PMID: 33158769.
80. Liu P, et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell*. 2011; 146:889–903. [PubMed: 21925314]
81. Tunç E, Ilgaz S. Robertsonian translocation (13;14) and its clinical manifestations: a literature review. *Reprod Biomed Online*. 2022 Sep;45(3):563-573. doi: 10.1016/j.rbmo.2022.05.019. Epub 2022 May 29. PMID: 35810081.
82. Antonarakis SE. Short arms of human acrocentric chromosomes and the completion of the human genome sequence. *Genome Res*. 2022 Apr;32(4):599-607. doi: 10.1101/gr.275350.121. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35361624; PMCID: PMC8997349.
83. Afzelius BA, Eliasson R. Male and female infertility problems in the immotile-cilia syndrome. *Eur J Respir Dis Suppl*. 1983;127:144-7. PMID: 6604647.
84. Duvuru R, Halabi M, Omolaoye TS, Du Plessis SS. The genetic causes of male infertility: a Middle East and North Africa perspective. *F1000Res*. 2022 Jan 31;11:125. doi: 10.12688/f1000research.106950.2. PMID: 36405559; PMCID: PMC9641111.
85. Solovova OA, Chernykh VB. Genetics of Oocyte Maturation Defects and Early Embryo Development Arrest. *Genes (Basel)*. 2022 Oct 22;13(11):1920. doi: 10.3390/genes13111920. PMID: 36360157; PMCID: PMC9689903.
86. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JI, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A. Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline PART II. *J Urol*. 2021 Jan;205(1):44-51. doi: 10.1097/JU.0000000000001520. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33295258.
87. Abraham M, Alramadhan S, Iniguez C, Duijts L, Jaddoe VW, Den Dekker HT, Crozier S, Godfrey KM, Hindmarsh P, Vik T, Jacobsen GW, Hanke W, Sobala W, Devereux G, Turner S. A systematic review of maternal smoking during pregnancy and fetal measurements with meta-analysis. *PLoS One*. 2017 Feb 23;12(2):e0170946. doi: 10.1371/journal.pone.0170946. PMID: 28231292; PMCID: PMC5322900.

88. Zhu Z, Li C, Yang S, Tian R, Wang J, Yuan Q, Dong H, He Z, Wang S, Li Z. Dynamics of the Transcriptome during Human Spermatogenesis: Predicting the Potential Key Genes Regulating Male Gametes Generation. *Sci Rep.* 2016 Jan 12;6:19069. doi: 10.1038/srep19069. PMID: 26753906; PMCID: PMC4750114.
89. Mantere T, Neveling K, Pebrel-Richard C, Benoist M, van der Zande G, Kater-Baats E, Baatout I, van Beek R, Yammine T, Oorsprong M, Hsoumi F, Olde-Weghuis D, Majdali W, Vermeulen S, Pauper M, Lebbar A, Stevens-Kroef M, Sanlaville D, Dupont JM, Smeets D, Hoischen A, Schluth-Bolard C, El Khattabi L. Optical genome mapping enables constitutional chromosomal aberration detection. *Am J Hum Genet.* 2021 Aug 5;108(8):1409-1422. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.05.012. Epub 2021 Jul 7. PMID: 34237280; PMCID: PMC8387289.
90. Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett.* 1994 Jun 1;19(11):780-2. doi: 10.1364/ol.19.000780. PMID: 19844443.