

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus der

Abteilung für Andrologie

(Direktor: Prof. Dr. med. W. Schulze)

der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

(Direktorin: Prof. Dr. med. I. Moll)

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Analyse der DNA-Integrität von ejakulierten und testikulären Spermatozoen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jennifer Duhnke
aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.12.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. W. Schulze

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. F. Sommer

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD U. Wehrenberg

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Infertilität.....	1
1.2	Assistierte Reproduktion.....	1
1.3	Spermiogrammparameter und ihre Relevanz zur Fertilitätsprädiktion.....	2
1.4	Zwei-Schritt-Hypothese.....	3
1.5	Ursachen der DNA-Fragmentierung.....	4
1.5.1	„Reactive oxygen species“ (ROS).....	4
1.5.2	Verhältnis von Protaminen zu Histonen.....	5
1.5.3	Entzündungen des Genitaltraktes.....	5
1.5.4	Varikozele.....	6
1.5.5	<i>Diabetes mellitus</i>	6
1.5.6	Maligne Erkrankungen, Chemo- und Radiotherapie.....	7
1.5.7	Ernährung.....	7
1.5.8	Rauchen.....	7
1.5.9	Alter des Mannes.....	8
1.5.10	Idiopathische Fertilitätsstörung – OAT-Syndrom.....	8
1.6	Messmethoden zur DNA-Fragmentierung.....	8
1.7	Apoptose und Akrosomreaktion.....	9
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	11
2	MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Untersuchungsgut.....	12
2.1.2	Chemikalien.....	13
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	13
2.1.4	Antikörper und Färbekomplexe.....	14
2.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.6	Geräte.....	15

2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Aufarbeitung des Ejakulats	16
2.2.2	Spermienausstriche	17
2.2.3	Spermienfixierung mit mDF.....	18
2.2.4	Spermienfixierung mittels Cytospin®	18
2.2.5	Hodenbiopsien in Paraffin.....	19
2.2.5.1	Modifizierter Johnsen Score	19
2.2.5.2	Entparaffinierung	21
2.2.5.3	Permeabilisierung.....	21
2.2.5.4	Positivkontrollen	21
2.2.6	Ausgestrichene Hodenbiopsien.....	21
2.2.7	Färbungen zur Erfassung von DNA-Fragmentierung	22
2.2.7.1	TUNEL-Färbung	22
2.2.7.2	Annexin V und Calcein-AM.....	23
2.2.8	Negativkontrollen	24
2.2.9	Durchflusszytometrische Untersuchung von Spermien	24
2.2.9.1	Bioanalyzer	25
2.2.9.2	Bioanalyzer-Untersuchungen	26
3	ERGEBNISSE	27
3.1	DNA-Fragmentierungsuntersuchungen an Spermienausstrichen.....	27
3.2	Spermienfixierung mittels Cytospin®	30
3.3	Vergleich unterschiedlicher Fixativa.....	35
3.4	Hodenbiopsien.....	36
3.4.1	Fluoreszenz am Beispiel des mJ-Score 10	37
3.4.2	Vergleich der einzelnen mJ-Scores.....	42
3.4.3	„Mixed Atrophy“	45
3.5	Ausgestrichene Hodenbiopsien	47
3.6	Bioanalyzergestützte Bestimmung von DNA-Fragmentierung in ejakulierten Spermien	50
3.6.1	Dot-Plot des Bioanalyzers.....	51

4	DISKUSSION	55
4.1	Der Bioanalyser	55
4.2	Untersuchungen an Spermienausstrichen	56
4.3	Untersuchungen an Hodenbiopsien	57
4.4	Der DNase-Verdau	60
4.5	Färbungen	61
4.6	Resümee	63
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	65
6	SUMMARY	66
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	67
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	69
9	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	74
	DANKSAGUNG.....	78
	LEBENS LAUF.....	79
	ERKLÄRUNG.....	80

1 EINLEITUNG

1.1 Infertilität

Infertilität wird durch das Ausbleiben einer Schwangerschaft nach mindestens 12 Monaten ungeschützten Geschlechtsverkehrs definiert. 15% aller Paare im reproduktionsfähigen Alter bekommen ungewollt keine Kinder. In etwa der Hälfte der Fälle ist männliche Infertilität die Ursache [Nieschlag & Behre, 2002; Paasch *et al.*, 2007].

Die WHO rechnet weltweit mit einem jährlichen Zuwachs von zwei Millionen betroffenen Paaren, sodass die Prävalenz sogar über der des *Diabetes mellitus* liegt [Paasch *et al.*, 2007; Nieschlag & Behre, 2009].

1.2 Assistierte Reproduktion

Assistierte Reproduktion bezeichnet ärztliche Maßnahmen zur Erfüllung des Kinderwunsches mit Hilfe medizinischer Techniken.

Die intrauterine Insemination (IUI) ist der natürlichste Weg der assistierten Reproduktion. Hier wird das aufbereitete Ejakulat in den Uterus eingebracht, sodass der Befruchtungsakt unter physiologischen Bedingungen intratubar erfolgt. Allerdings sind die Erfolgsraten sehr variabel und liegen zwischen 5 - 66% pro Menstruationszyklus [Paasch *et al.*, 2007].

Bei der „in-vitro-Fertilisierung“ (IVF) handelt es sich um eine extrakorporale Befruchtung mit einem anschließenden Embryonentransfer. Spermium und Eizelle werden örtlich dicht zueinander gebracht. Die Befruchtung erfolgt hierbei eigenständig durch das Spermium [Nieschlag & Behre, 2009].

Bei der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) wird das Spermatozoon unter Umgehung der Zona pellucida und der Vitellinmembran direkt in die Oozyte injiziert, sodass auch mit immotilen Spermien eine Schwangerschaft erzielt werden kann [Aitken *et al.*, 2008; Nieschlag & Behre, 2009].

Die Gewinnung der Spermatozoen zur künstlichen Befruchtung kann entweder *per ejaculationem* oder operativ erfolgen.

Die testikuläre Spermatozoenextraktion (TESE) ist eine Möglichkeit zur operativen Gewinnung von Spermien bei obstruktiver (OA) und nicht obstruktiver (NOA) Azoospermie. Bei diesem Eingriff werden spermienhaltige testikuläre Biopsien kryokonserviert und später für eine ICSI-Behandlung aufgearbeitet.

1.3 SpermioGrammparameter und ihre Relevanz zur Fertilitätsprädiktion

Die Ejakulatparameter werden standardisiert nach den Richtlinien der WHO erfasst. Darin sind die unteren Grenzwerte für Morphologie, Motilität, Spermienkonzentration und Gesamtspermienzahl vermerkt, die mit der Induktion einer Spontan gravidität innerhalb eines Jahres noch vereinbar sind (5er Perzentilenwerte) [World Health Organization, 2010].

Die WHO-Kriterien sind zur Fertilitätsdiagnostik jedoch nur eingeschränkt aussagekräftig [Varghese *et al.*, 2009]. Aus diesem Grund wurden weitere Tests entwickelt, um zusätzliche Kenntnisse über den Fertilitätsstatus zu erlangen. Dabei wird insbesondere der Relevanz der DNA-Fragmentierung von Spermien nachgegangen. Einige Studien belegen, dass eine geringe DNA-Fragmentierungsrate ein entscheidender, positiver Fertilitätsparameter ist [Shamsi *et al.*, 2008; American Society for Reproductive Medicine, 2008]. Somit können Patienten trotz normalen SpermioGramms infertil sein [Nieschlag & Behre, 2009]. Collins *et al.* (2008) haben mehrere Studien verglichen und festgestellt, dass zwar ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen DNA-Integrität und IVF-/ICSI-Schwangerschaftsraten besteht, dieser jedoch nicht als Indikation für eine Routinetestung ausreicht. Lin *et al.* (2008) beschreiben, dass die DNA-Integrität weder ein Prädiktor für IVF- oder ICSI-Fertilisierungsraten noch für die Embryonenqualität sei. Sie haben jedoch eine signifikant höhere Abortrate bei einem DNA-Fragmentierungsindex (DFI) >27% festgestellt.

1.4 Zwei-Schritt-Hypothese

Die DNA-Fragmentierung von Spermien kann intratestikulär, d.h. im Keimepithel, oder posttestikulär, d.h. im Bereich der ableitenden Samenwege, entstehen. Aitken *et al.* (2008) haben eine Hypothese aufgestellt, wie es in zwei Schritten zur DNA-Fragmentierung kommen kann (Abbildung 1.1).

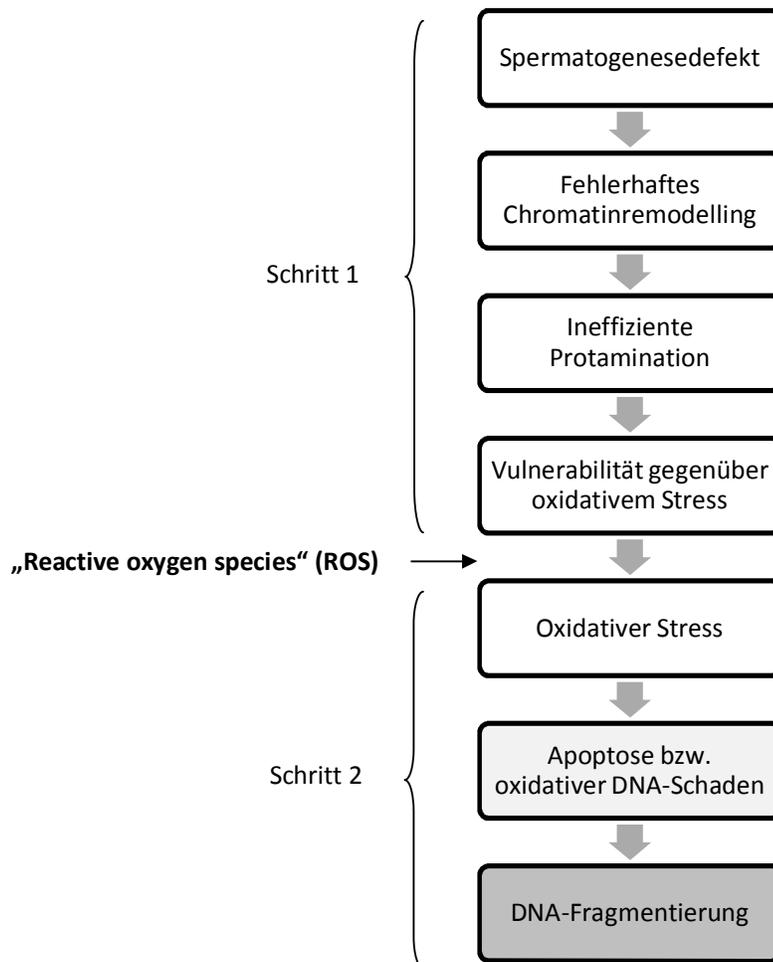


Abbildung 1.1: Zwei-Schritt-Hypothese zur Entstehung von DNA-Fragmentierung in Spermien durch reaktive Sauerstoffradikale nach vorausgegangenem Spermatogenesedefekt [modifiziert nach Aitken *et al.*, 2008; De Iulii *et al.*, 2009; Aitken & De Iulii, 2009].

DNA. Posttestikulär führt diese durch den Einfluss freier Sauerstoffradikale, welche z.B. durch eine erhöhte Leukozytenanzahl im Ejakulat vermehrt auftreten können, zur DNA-Fragmentierung [Zini & Libman, 2006; Paasch *et al.*, 2007; Aitken & De Iliis, 2009].

Einer anderen These zufolge produzieren Mitochondrien von defekten Spermien bereits nach dieser Theorie kommt es intratestikulär zu einer Vorschädigung der Spermien-im Keimepithel eine große Anzahl freier Radikale. Der entscheidende Schritt zur DNA-Fragmentierung wird hier als intratestikuläres Ereignis angesehen [Zini & Libman, 2006; Paasch *et al.*, 2007; Aitken & De Iliis, 2009].

Kleine DNA-Strangbrüche kommen während der Spermatogenese regelmäßig vor und können durch verschiedene Reparaturmechanismen des Körpers wieder behoben werden. DNA-Strangbrüche größeren Ausmaßes sind jedoch irreparabel. In diesen Fällen kommt es trotz normaler Spermienmorphologie seltener zur regelrechten Implantation befruchteter Eizellen bzw. häufiger zu Frühaborten [Shamsi *et al.*, 2008]. Einige Studien haben gezeigt, dass die Befruchtung einer Eizelle auf natürlichem Wege ab einer DNA-Fragmentierungsrate von 27-30% der Spermien im Ejakulat unwahrscheinlich oder zumindest deutlich erschwert ist [Paasch *et al.*, 2007].

1.5 Ursachen der DNA-Fragmentierung

1.5.1 „Reactive oxygen species“ (ROS)

Freie Sauerstoffradikale („reactive oxygen species“ (ROS)) entstehen physiologisch während der Atmungskette in den Mitochondrien und sind oxidativ wirksam. Sie werden bei einer erhöhten Leukozytenanzahl im Ejakulat vermehrt freigesetzt und können die Spermienfunktion dann maßgeblich negativ beeinflussen [Cocuzza *et al.*, 2007; Paasch *et al.*, 2007; Nieschlag & Behre, 2009]. Werden bei entzündlichen Erkrankungen, wie einer Epididymitis oder einer Prostatitis, Leukozyten aktiviert, steigt also der ROS-Anteil im Ejakulat deutlich an [Shamsi *et al.*, 2008]. Durch eine Dysbalance zwischen ROS und Antioxidantien verschlechtern sich Motilität, Vitalität und Fertilisierungsfähigkeit der Spermien [Nieschlag & Behre, 2002; Aitken & Baker, 2006; Paasch *et al.*, 2007].

ROS greifen die DNA in Zellkern und Mitochondrien an. Sie induzieren DNA-Strangbrüche und führen zu Chromosomenabberationen, welche wiederum die Tertiärstruktur der DNA verändern können. Somit beeinflussen sie auch die Expression verschiedener Transportproteine und Rezeptoren [Aitken & Baker, 2006; Shamsi *et al.*, 2008].

1.5.2 Verhältnis von Protaminen zu Histonen

Protamine sind Proteine zur DNA-Kondensierung, die während der Spermatogenese in den Zellkernen der Spermien die Histone teilweise ersetzen. In somatischen Zellen kommen Protamine nicht vor. Hier ist die DNA ausschließlich um Histone gewickelt. Im Kopf eines Spermiums ist die DNA dagegen zu etwa 85% um Protamine gewunden, welche diese stärker kondensieren und damit widerstandsfähiger gegenüber äußeren Einflüssen machen als Histone [Shamsi *et al.*, 2008].

Die Neuformierung der Zelle wird als zytoplasmatisches und nukleäres Remodeling bezeichnet. Der durch Protamine kondensierte DNA-Anteil liegt anschließend zentral im Nukleus [Paasch *et al.*, 2007; Aitken *et al.*, 2008]. In der Peripherie dagegen ist histonreiche DNA zu finden, da hier Gene kodiert sind, die für die Befruchtung und die frühe Entwicklung des Embryos nötig sind und leichter zugänglich sein müssen [Zini & Libman, 2006].

Protamine sind cysteinreich und vernetzen die DNA sowohl inter- als auch intramolekular über Disulfidbrücken [Paasch *et al.*, 2007; American Society for Reproductive Medicine, 2008; Nieschlag & Behre, 2009]. Deutlich wird die Effektivität der Protamine auch anhand der Größe der Chromosomen. Ein Chromosom, das um Protamine formiert ist, ist sechsfach kleiner als dasselbe, durch Histone kondensierte Chromosom [Paasch *et al.*, 2007].

Steigt der Anteil der ROS, verändert sich die Chromatinkondensierung, da der Anteil der Protamine zugunsten des Histonanteils sinkt [Henkel *et al.*, 2010]. Verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der Histone, ist die DNA anfälliger für Strangbrüche, und die Zelle weist in der Regel einen höheren DNA-Fragmentierungsindex (DFI) auf [Zini & Libman, 2006; Shamsi *et al.*, 2008; American Society for Reproductive Medicine, 2008; Varghese *et al.*, 2009].

1.5.3 Entzündungen des Genitaltraktes

Eine Entzündung lockt, wie unter 1.5.1 beschrieben, durch inflammatorische Zytokine, z.B. Interleukin (IL) 6 und 8, Leukozyten in das Gewebe. Durch die hierbei entstehenden Sauerstoffradikale wird die Spermien-DNA geschädigt [Paasch *et al.*, 2007]. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Genitaltraktentzündungen sowohl Spermienmotilität als auch Fertilisierungsfähigkeit nachlassen können [Cocuzza *et al.*, 2007]. Insbesondere bei chronischen Entzündungen entwickelt sich durch eine Leukozytospemie und den damit verbundenen ROS-Anstieg sehr häufig oxidativer

Stress, welcher zu einer Erhöhung der DNA-Fragmentierung führt [Cocuzza *et al.*, 2007; Aitken & De Iluis, 2009].

1.5.4 Varikozele

Die Varikozele gehört zu dem Krankheitsbild der *Varikosis* und ist eine tast- und/oder sichtbare Erweiterung der Venen des Plexus pampiniformis [Becker *et al.*, 2006]. Die Prävalenz liegt bei 15% der männlichen Normalbevölkerung. In der andrologischen Praxis wird bei bis zu 25% der Patienten eine Varikozele diagnostiziert [Nieschlag & Behre, 2009]. Eine Varikozele ist mit oxidativem Stress und einer erhöhten DNA-Fragmentierungsrate assoziiert, welche in 40% der Fälle zu Fertilitätsproblemen führt [Paasch *et al.*, 2007; Nieschlag & Behre, 2009]. Die Pathogenese der varikozelenbedingten Fertilitätsminderung ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird von einer Minderdurchblutung aufgrund des erhöhten venösen Drucks ausgegangen, welcher sogar zur Atrophie und somit zur Hodenvolumenverminderung führen kann [Nieschlag & Behre, 2009]. Es kommt jedoch nicht nur zu einer venösen Druckerhöhung, sondern auch zu einer Erhöhung der intratestikulären Temperatur, wodurch Stickstoffmonoxid (NO) freigesetzt wird und zu einem signifikanten Anstieg der freien Radikale führt [Cocuzza *et al.*, 2007].

1.5.5 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus (sowohl Typ 1 als auch Typ 2) kann neben Potenzstörungen auch zur diabetesspezifischen Mikroangiopathie mit Verdickung der kapillären Basalmembran führen, die nicht nur im Auge und an den Akren, sondern auch im Hoden durch Perfusionsstörungen das Gewebe schädigen kann [Herold, 2008]. Damit geht ein Anstieg des DFI der Spermatozoen einher [Aitken *et al.*, 2008]. Zudem wurde im Tiermodell gezeigt, dass bei Diabetikern „advanced glycation endproducts“ (AGE) am Spermatozoon und im Keimepithel zu finden sind [Paasch *et al.*, 2007]. Inwieweit diese den DFI beeinflussen, ist noch zu untersuchen.

1.5.6 Maligne Erkrankungen, Chemo- und Radiotherapie

Bei jungen Männern mit einer malignen Erkrankung, wie z.B. einem Hodgkin-Lymphom (monoklonales B-Zell-Lymphom) oder einem malignen Hodentumor, liegt schon vor der Therapie eine schlechtere Ejakulatqualität als bei gesunden Gleichaltrigen vor. Insbesondere der DFI ist erhöht [Zini & Libman, 2006; Paasch *et al.*, 2007].

Häufig sind noch viele Jahre nach Bestrahlung oder Chemotherapie DNA-Schäden nachweisbar, da die Therapie sowohl mutagen als auch teratogen ist [Paasch *et al.*, 2007; Herold, 2008]. Kommt es trotz erhöhter Fragmentierungsrate zur Schwangerschaft, ist allerdings keine erhöhte Anzahl genetischer Defekte oder kongenitaler Malformationen nachweisbar [Paasch *et al.*, 2007].

1.5.7 Ernährung

Bei einem Screening Wehrpflichtiger zwischen 18 und 21 Jahren ist festgestellt worden, dass es mit Zunahme des Body-Mass-Index (BMI) über 25 kg/m² zu einer Abnahme der Spermatozoen mit intaktem Chromatin im Ejakulat kommt [Paasch *et al.*, 2007]. Ungesättigte Fettsäuren, die sich durch einen hohen Blutfettspiegel in Spermien ansammeln, sind ebenfalls Auslöser für oxidativen Stress, da ROS an ungesättigte Fettsäuren binden [Aitken & De Iuuiis, 2009]. Bei 71% der Patienten mit unerfülltem Kinderwunsch in einer andrologischen Praxis liegt der BMI ≥ 24 kg/m², sodass von einer signifikanten Korrelation ausgegangen werden kann [Paasch *et al.*, 2007].

Schon bei erhöhtem Kaffeegenuss ab einer Menge von mehr als drei Tassen täglich ist von einer Erhöhung der DNA-Fragmentierung auszugehen [Paasch *et al.*, 2007].

1.5.8 Rauchen

Raucher haben durch die Toxine, Karzinogene und Mutagene, die sie über die Lunge aufnehmen, einen hohen Anteil aktivierter Leukozyten und damit auch vermehrt freie Radikale im Ejakulat [Cocuzza *et al.*, 2007]. Es zeigen sich entzündliche Veränderungen wie bei einer primären Entzündung des Genitaltrakts, welche ätiologisch durch die sogenannte Raucherleukozytose zu begründen sind [Herold, 2008]. Das Rauchen von Zigaretten ist aber nicht nur mit einem ROS-Anstieg assoziiert, sondern auch mit einer geringeren Spermienanzahl im Ejakulat und einer schlechteren Spermienmotilität, sowie Chromatindefekten, Disomie und Minisatellitenmutationen [Zini & Libman, 2006; Paasch *et al.*, 2007; Cocuzza *et al.*, 2007; Nieschlag & Behre, 2009].

Die DNA-Fragmentierung eines Spermiums, welche durch den oxidativen Stress eines rauchenden Mannes hervorgerufen wurde [Evenson & Wixon, 2006], verhindert jedoch nicht nur die Kapazitation, die Befruchtung oder die Implantation der Eizelle. Stattdessen erhöht sich auch signifikant die Inzidenz von malignen Erkrankungen des Nachwuchses in dessen Kindheit [Aitken *et al.*, 2008; Aitken & De Iliis, 2009].

1.5.9 Alter des Mannes

Bei Ejakulatuntersuchungen wurde festgestellt, dass höheres Lebensalter mit einer höheren Fragmentierungsrate der Spermien-DNA einhergeht [American Society for Reproductive Medicine, 2008; Aitken *et al.*, 2008]. Die Inzidenz von Fehlgeburten ist bei zunehmendem Alter der Väter erhöht. Auch Chromosomendefekte, Neuralrohrdefekte, Schizophrenie und Autismus sind bei diesen Kindern deutlich häufiger zu verzeichnen als bei Kindern jüngerer Väter [Aitken *et al.*, 2008].

1.5.10 Idiopathische Fertilitätsstörung – OAT-Syndrom

Beim OAT-Syndrom (Oligoasthenoteratozoospermie-Syndrom), welches sehr häufig idiopathischer Genese ist (iOAT - idiopathische Oligoasthenoteratozoospermie) [Cavallini, 2006], sind alle Hauptparameter eines Spermioграмms eingeschränkt: die Spermienkonzentration, die Motilität sowie die Morphologie.

Viele, teilweise hier schon genannte Faktoren können ursächlich am OAT-Syndrom, bei dem zumeist ein erhöhter DFI der Spermien-DNA besteht, beteiligt sein [Varghese *et al.*, 2009].

1.6 Messmethoden zur DNA-Fragmentierung

Eine verbreitete Methode zur Bestimmung der Fragmentierungsrate der Spermien-DNA ist die Durchflusszytometrie (vgl. Abschnitt 2.2.9). Durchflusszytometrie und FACS™ (Fluorescence Activated Cell Sorting) werden oft synonym verwendet. Das Prinzip des FACS™ beruht auf Lichtemissionen einer Zelle beim Passieren des Laserstrahls. Mittels verschiedener Färbungen kann so auch die Fragmentierungsrate von Spermien bestimmt werden.

Mit dem Farbstoff Acridine Orange (AO) werden fragmentierte und nicht fragmentierte Zellen unterschiedlich farblich markiert. Bei dieser Messung interkaliert der Farbstoff in die DNA, nachdem die Zellen Säure oder Hitze ausgesetzt worden sind [Paasch *et al.*, 2007]. Der DFI, welcher das Verhältnis der unterschiedlich gefärbten Zellen zueinander

angibt, kann dann entweder mittels SCSA[®] (Sperm Chromatin Structure Assay) oder auch im Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden.

SCSA[®] ist eine häufig verwendete Methode, bei der durch Säure denaturierte, mit AO markierte Spermien durchflusszytometrisch erkannt und quantifiziert werden [Paasch *et al.*, 2007]. Anschließend wird der Spermienanteil mit fragmentierter DNA im Dot-Plot grafisch sichtbar gemacht.

Indirekte Methoden wie diese basieren auf der Theorie, dass geschädigte DNA bei pH-Veränderung oder Hitze schneller denaturiert als intakte DNA [Varghese, *et al.*, 2009].

Mit der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) werden DNA-Strangbrüche direkt mit Fluoreszenzfarbstoff markiert und im Fluoreszenzmikroskop so sichtbar und zählbar gemacht (vgl. 2.2.7.1) [Paasch *et al.*, 2007].

Annexin V macht apoptotische Zellen in roter Fluoreszenz kenntlich (vgl. Abschnitt 2.2.7.2), da der Farbstoff an Phosphatidylserin (PS) bindet, welches während der Apoptose von der Innenseite der Zellmembran an die Außenseite transportiert wird.

1.7 Apoptose und Akrosomreaktion

Apoptose ist ein wichtiger Biomechanismus, um gealterte oder beschädigte Zellen zu eliminieren. Im Hoden dient der programmierte Zelltod aber auch der Kontrolle von Zellzahl und Homöostase [Oldereid *et al.*, 2001].

Kryptorchismus, Varikozelen, fieberhafte Infekte, erhöhtes Alter sowie Chemotherapie und Bestrahlung können die Zahl apoptotischer Zellen um ein Vielfaches erhöhen. Genauso können Arzneimittel, Pestizide sowie Toxine, die z.B. durch das Rauchen im Hoden akkumulieren, vermehrte DNA-Fragmentierung induzieren und somit zu verminderter Fertilisierungsfähigkeit führen [Paasch *et al.*, 2007; American Society for Reproductive Medicine, 2008; Paul *et al.*, 2008].

Aitken *et al.* (2008) bekräftigten in ihrem Review die These, vor allem oxidativer Stress durch Sauerstoffradikale (ROS) führe zu Apoptose und vermehrter Fragmentierung (Abbildung 1.1).

Als einer der frühesten Prozesse während der Apoptose verliert die Zelle ihre Membranasymmetrie. Das Phospholipid Phosphatidylserin (PS), welches bei einer vitalen Zelle nahezu vollständig auf der intrazytoplasmatischen Membranseite gelegen ist [Leschner, 2006], wird an die Außenseite der Membran transportiert [Oosterhuis & Vermes, 2004; Said *et al.*, 2006]. So kann eine apoptotische Zelle phagozytiert werden. Annexin V bindet an externalisiertes PS [Oosterhuis & Vermes, 2004].

Damit ein Spermium an die Oozyte binden kann, wird jedoch auch bei der Akrosomreaktion PS externalisiert [Leschner, 2006]. Die Beurteilung der Apoptoserate

mittels des Annexin-V-Tests ist bei Spermien gegenüber somatischen Zellen deutlich schwieriger, da Annexin V nicht zwischen Akrosomreaktion und Apoptose unterscheidet.

Eine Akrosomreaktion kann nicht nur physiologische Auslöser haben. Auch externe Stimuli, wie niedrige Temperaturen, ein elektrischer Stromstoß oder die Verwendung von Kalziumionophoren, können eine Akrosomreaktion auslösen [Skrzypek, 1999].

Die PS-Externalisierung ereignet sich während einer sehr frühen Phase der Apoptose, sodass die Annexin-V-Färbung nicht mit der DNA-Fragmentierung korreliert [Stadelmann & Lassmann, 2000; Oosterhuis & Vermes, 2004]. Evenson & Wixon (2006) fanden zudem keine Korrelation zwischen Apoptose bzw. Annexin-V-Färbung und Fertilisierungs- oder Schwangerschaftsraten.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Eine zunehmende Anzahl von Studien weist darauf hin, dass die DNA-Fragmentierung in Spermien einen signifikanten Einfluss auf die Fertilisierungsfähigkeit sowie die Implantations- und Schwangerschaftsraten hat. Ein gängiges Verfahren zur Bestimmung dieser Fragmentierungsrate ist die Durchflusszytometrie (FACS™), bei der die DNA-Fragmentierung mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht wird. Diese Methodik ist jedoch für eine andrologische/urologische Praxis nicht erschwinglich, da die entsprechende Hardware sehr teuer ist. Seit ein paar Jahren gibt es eine Variante, den sogenannten Bioanalyzer, der ein flowcytometrisches Modul besitzt und durch seinen Preis (22.000 €) auch für kleinere Praxen interessant sein könnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob dieses Gerät im Hinblick auf die Untersuchung der DNA-Fragmentierung eine Alternative darstellt.

Neue Studien lassen vermuten, dass die DNA-Fragmentierung ein posttestikuläres Ereignis ist, d.h. dass die DNA im Spermienkopf auf dem Weg durch die ableitenden Samenwege zunehmend fragmentiert. Anhand von histologischen Schnitten testikulärer Biopsien soll deshalb mittels der TUNEL-Methode überprüft werden, ob die Fragmentierung bereits in den Keimzellen des Hodens auftritt und welche Keimzelltypen dieses betrifft.

Die DNA-Fragmentierung wird bei Patienten, welche Ejakulate im Rahmen der Spermogramm-Untersuchung in der andrologischen Abteilung des UKE gespendet haben, untersucht. Neben der fluoreszenzmikroskopischen Analyse soll auch eine flowcytometrische Auftrennung mittels Bioanalyzer erfolgen. Zudem steht die Untersuchung der intratestikulären DNA-Fragmentierung an histologischen Schnitten bei verschiedenen Zuständen des spermatogenetischen Status im Vordergrund.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsgut

Das untersuchte Ejakulat stammte von Kinderwunsch-Patienten aus der Sprechstunde der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Ejakulatanalyse erfolgte nach den Regularien der WHO [World Health Organization, 2010].

Alle Hodenbiopsien entstammten einem Patientenkollektiv, bei dem der Versuch einer testikulären Spermatozoenextraktion (TESE) unternommen wurde [Jezek *et al.*, 1998]. Nach 24-stündiger Fixierung in modified Davidson's Fluid (mDF) wurden die Biopsien in Paraffin eingebettet und auf Objektträger gebracht.

Für weitere Versuche an Nativmaterial wurden Proben eine Stunde in IVF-Medium (SpermPrep™) inkubiert, bevor sie unter einem Lichtmikroskop auf testikuläre Spermatozoen untersucht wurden. Anschließend wurden die Gewebsfragmente auf polylysinbeschichtete Objektträger aufgetragen, soweit wie möglich ausgestrichen und luftgetrocknet.

Für die Entnahme und Untersuchung der Proben lagen die Zustimmungen der Patienten und der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg vor (Positives Votum vom 04.10.2005: OB/X/2000).

2.1.2 Chemikalien

Citronensäure	Merck-Schuchardt
DePeX	SERVA Electrophoresis
DNase 1, Amplification Grade	Sigma-Aldrich®
EDTA	Sigma-Aldrich®
Essigsäure	Carl Roth®
Ethanol absolut	Merck
Ethanol absolut (vergällt)	Th. Geyer
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Paraformaldehyd (PAF)	Sigma-Aldrich®
Poly-L-Lysine Solution	Sigma-Aldrich®
Proteinase K	Macherey-Nagel
Salzsäure (HCl)	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tris	Carl Roth®
TritonX-100	Sigma-Aldrich®
Xylol (Isomere)	Carl Roth®

2.1.3 Puffer und Lösungen

Cell Kit (Cell Solutions Series II)	Agilent Technologies
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich®
PureSperm® Wash	Nidacon
PureSperm® 100	Nidacon
PureSperm® Buffer	Nidacon
SpermPrep™ Media	Zavos Diagnostic Laboratories

Modified Davidson's Fluid:

30%	Paraformaldehyd (37-40%)
15%	Ethanol absolut
5%	Essigsäure
50%	bidestilliertes Wasser

PAF/PBS:

- 4% Paraformaldehyd (PAF)
- 96% Phosphate Buffered Saline (PBS)

Permeabilisierungspuffer:

Citratpuffer:

- 0,1% TritonX-100
- 0,1% tri-Natriumcitrat-Dihydrat
- bidestilliertes Wasser

Puffer ohne Citrat:

- 0,1% TritonX-100
- PBS

Puffer mit Proteinase K:

- 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 20 µl/ml Proteinase K

2.1.4 Antikörper und Färbekomplexe

Annexin V	invitrogen™
Calcein-AM	invitrogen™
In Situ Cell Death Detection Kit, AP	Roche

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel-Gläser
Shandon Filter Cards	Thermo Electron Corporation
Hybridisierungskammern HybriWell™	Sigma-Aldrich®
Shandon Megafunnel™ Slideclip®	Thermo Electron Corporation
Shandon Objektträger (Histoslides®)	Thermo Electron Corporation
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser
Pipetten	Gilson®
Pipettenspitzen	Biozym®
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf
15 ml-Reaktionsgefäße	greiner bio-one
Spitzenaufsatzfilter Minisart®	Sartorius
Testsimplets®	Waldeck

2.1.6 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Feinwaage 1615 MP	Sartorius AG
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81	Olympus
Heizrührer IKAMAG® RH	IKA® Werke GmbH & Co. KG
Inkubations-/Inaktivierungsbad	GFL®
Kühlzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Megafuge 2.0 R	Heraeus
Lichtmikroskop Axiovert 100	Zeiss
Lichtmikroskopkamera: AxioCam ICc3	Zeiss
pH-Meter, pH 526	WTW GmbH
Wasserreinigung Milli-Q®	Millipore™
Zytozentrifuge Shandon Cytospin® 3	Thermo Electron Corporation

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung des Ejakulats

Für die Aufreinigung der Ejakulate nach Verflüssigung wurden zunächst drei unterschiedliche Methoden getestet.

Es stand pro Untersuchungsgang 1 ml Ejakulat zur Verfügung. Dieses wurde in 5 ml PBS in einem 15 ml-Reaktionsgefäß verdünnt und dann 5 Minuten bei 2000 rpm und 25°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt.

In einem anderen Ansatz wurde das Ejakulat in 5 ml PureSperm® Wash aufgenommen und 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert, bevor der Überstand abgekippt wurde.

Um eine besser Selektion von Spermien zu erlangen, wurde das Ejakulat in einem dritten Ansatz über einen Gradienten mit zwei Konzentrationsstufen mit PureSperm® von Nidacon nach deren Protokoll [Nidacon, 2009] gewaschen (Abbildung 2.1).

Mit diesem Protokoll kann eine Auftrennung des Ejakulats in drei Phasen erreicht werden. Am Grund des Reaktionsgefäßes befand sich ein Pellet aus selektierten motilen Spermien (Phase 1). Über dem Pellet war eine Säule aus PureSperm® 80%, in der noch motile Spermien vorkamen. Phase 2 bestand aus unreifen Spermatiden. Hier waren auch schon nicht germinative Elemente enthalten, wie Leukozyten oder Zellen epithelialer Herkunft, welche aber vor allem in Phase 3 vorkamen.

In der Phase von PureSperm® 40% sollten sich – laut Hersteller – die immotilen und avitalen Spermien befinden (Phase 3) [Nidacon, 2009]. Ganz oben, also über Phase 3, war das verbliebene, weitgehend zellfreie Seminalplasma zu finden.

Um diese bei der Aufarbeitung entstandenen drei Phasen zu kontrollieren, wurde aus jeder Phase eines Reaktionsröhrchens eine Probe entnommen und auf vorgefärbte Objektträger (Testsimplets®) gegeben.

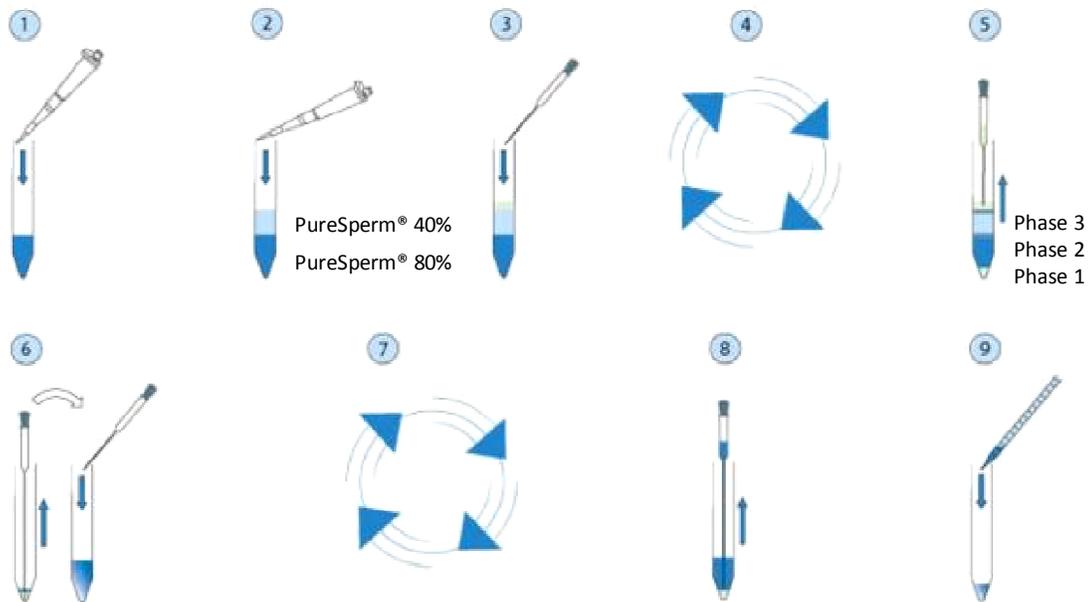


Abbildung 2.1: Selektion von Spermien [Nidacon, 2009].

1: 2 ml PureSperm® 80% **2:** vorsichtig 2 ml PureSperm® 40% auf PureSperm® 80% pipettieren **3:** 1 ml Ejakulat vorsichtig auf beide Schichten pipettieren **4:** Reaktionsröhren bei 1400 rpm 20 min zentrifugieren **5:** Sterile Pipette 1-2 mm in die oberste Schicht eintauchen und Schicht für Schicht abtragen **6:** etwa 2 mm von PureSperm® 80% über dem Pellet stehen lassen, dieses mit neuer Pipettenspitze absaugen, in ein steriles Reaktionsröhrchen mit 1 ml PureSperm® Wash pipettieren und suspendieren **7:** 10 min bei 2000 Umdrehungen zentrifugieren **8:** PureSperm® Wash vorsichtig abpipettieren **9:** weitere Schritte je nach Protokoll [Nidacon, 2009].

Da durch die Spermiselektion über einen Gradienten mit verschiedenen Konzentrationsstufen jedoch keine eindeutige Verbesserung der Spermienqualität festzustellen und zudem keine ausreichende Anzahl Spermien zur Analyse zu erreichen war, wurde die eingangs erwähnte Aufreinigung des Ejakulats mittels PBS standardisiert verwandt.

2.2.2 Spermienausstriche

Die aus dem unter 2.2.1 beschriebenen Waschschrift pelletierten Spermatozoen wurden in 1 ml PureSperm® Wash resuspendiert, luftgetrocknet und in PBS mit 4% Paraformaldehyd (PAF) für eine Stunde auf dem Objektträger fixiert. Anschließend wurden die Objektträger zwei Mal 5 Minuten in PBS gewaschen.

Die Zellen wurden mit einem Puffer aus 0,1% TritonX-100 und 0,1% tri-Natriumcitrat-Dihydrat für 8 Minuten permeabilisiert, bevor sie wieder zwei Mal 5 Minuten mit PBS gewaschen wurden.

Positivkontrollen wurden mit 50 µl DNase I (Sigma-Aldrich®) pro Objektträger (10 µl DNase Puffer, 85 µl bidestilliertes Wasser, 5 µl DNase I) 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger wieder in PBS gewaschen.

2.2.3 Spermienfixierung mit mDF

Da die Hodenbiopsien in modified Davidson's Fluid (mDF) fixiert wurden (vgl. Abschnitt 2.2.5), sollten zum besseren Vergleich auch einige Spermienausstriche auf diese Art fixiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Ejakulate wie für den Ansatz bei PAF-Fixierung gewaschen, auf Objektträgern ausgestrichen und luftgetrocknet.

Die Spermien wurden dann für 1 Stunde auf den Objektträgern in mDF fixiert und anschließend zwei Mal 5 Minuten in PBS gewaschen.

2.2.4 Spermienfixierung mittels Cytospin®

Um die O₂-Exposition der Spermien vor der Untersuchung möglichst gering zu halten, wurde das Ejakulat mit der Zytocentrifuge Cytospin® 3 auf den Objektträger aufgebracht und dort gleichzeitig fixiert (Abbildung 2.2).

Dafür wurde das Ejakulat gewaschen (vgl. 2.2.1) und zehnfach verdünnt. Es wurden 10 µl des verdünnten Ejakulats in 100 µl PBS mit 4% Paraformaldehyd bzw. modified Davidson's Fluid aufgenommen und in den Cytofunnel® pipettiert. Das ist ein kleiner Trichter mit einem seitlichen Ausgang, der auf ein spezielles Filterpapier und den Objektträger gerichtet ist (Abbildung 2.2).

Die zusammengesetzten und mit dem Slideclip® fixierten Teile wurden beschickt und in der Zytocentrifuge für 4 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert.

Danach wurde wie bei den Spermienausstrichen (vgl. 2.2.2) verfahren. Die Proben wurden permeabilisiert, die Positivkontrollen nach einem erneuten Waschschrift mit DNase inkubiert.

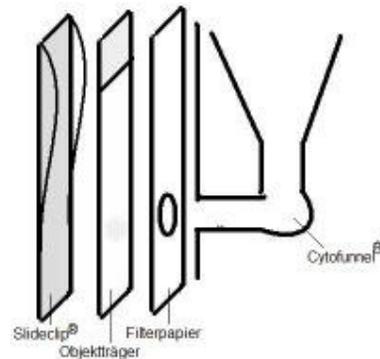


Abbildung 2.2: Zusammensetzung aller Teile für die Verwendung des Cytospin® (Thermo).

2.2.5 Hodenbiopsien in Paraffin

Die gemäß dem Kryo-TESE-Konzept (Abbildung 2.3) entnommenen Hodenbiopsien wurden nach Entnahme für 24 Stunden in modified Davidson's Fluid fixiert und anschließend für die konventionelle Paraffinhistologie aufbereitet.

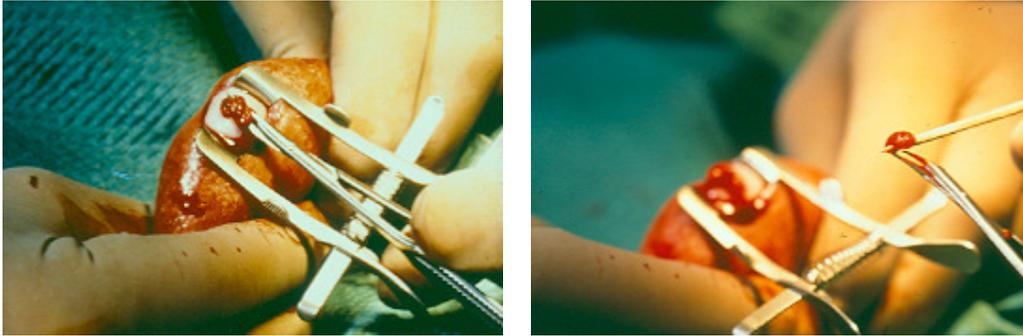


Abbildung 2.3: Biopsische Entnahme von Hodengewebe zur testikulären Spermatozoenextraktion (TESE) [Schulze, 1996].

Die aufbereiteten histologischen Präparate wurden mikroskopisch mittels eines standardisierten Scores benotet und klassifiziert.

2.2.5.1 Modifizierter Johnsen Score

Die histologische Klassifizierung der Hodenbiopsien erfolgte mittels des modifizierten Johnsen Scores (mJ-Score) (Abbildung 2.4) [Ezeh *et al.*, 1998].

Dieses Scoring-System erfasst den Spermatogenesestatus auf einer Skala von eins (keine Keim- bzw. Sertolizellen) bis zehn (intakte Spermatogenese) (Tabelle 2.1) [Johnsen, 1970; De Kretser & Holstein, 1976; Schulze *et al.*, 1999; Nieschlag & Behre, 2002; Holstein *et al.*, 2003].

Von den zehn Scores sind sieben Hauptkategorien („Hauptscores“) klinisch relevant (Abbildung 2.4). Dabei werden mJ-Score vier und fünf (Arrest auf dem Niveau der Spermatozyten), mJ-Score sechs und sieben (Arrest auf dem Niveau der frühen Spermatischen) und mJ-Score neun und zehn (intakte Spermatogenese) zusammengefasst [Feig *et al.*, 2007].

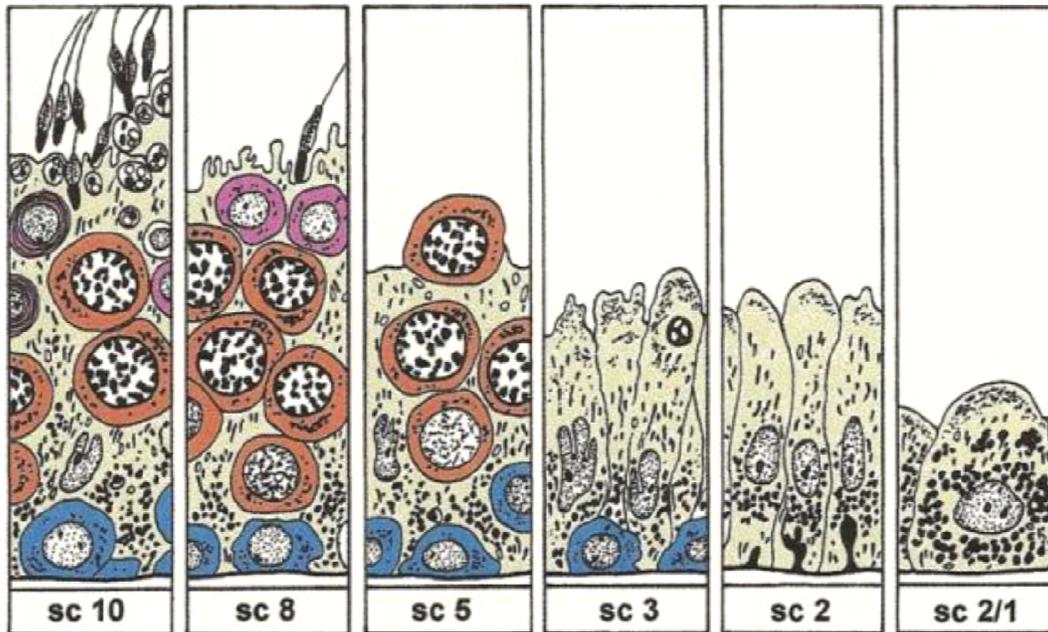


Abbildung 2.4: Darstellung von sechs der sieben klinisch relevanten Hauptscores zur Erfassung des spermatogenetischen Status in Hodenbiopsien [Nieschlag & Behre, 2002].

Tabelle 2.1: Bewertung des spermatogenetischen Status mittels des modifizierten mJ-Scores [Johnsen, 1970; De Kretser & Holstein *et al.*, 1976; Schulze *et al.*, 1999; Nieschlag & Behre, 2002; Holstein *et al.*, 2003].

mJ-Score	Histologie
Score 10	Intakte Spermatogenese: >20 reife Spermatozoen pro Tubulus und viele Spermiationszonen
Score 9	Leichte Hypospermatogenese: >20 reife Spermatozoen pro Tubulus; wenige Spermiationszonen
Score 8	Deutliche Hypospermatogenese: <20 reife Spermatozoen pro Tubulus, keine Spermiationszonen
Score 7	Spermatozytendifferenzierungsstörung: Keine reifen Spermatozoen; zahlreiche rundkernige, unreife Spermatozoen
Score 6	Spermatozytendifferenzierungsstörung: Keine reifen Spermatozoen; wenig rundkernige, unreife Spermatozoen
Score 5	Spermatogenese-Arrest bei Spermatozyten I: Keine Spermatozoen; viele Spermatozyten I im Tubuluslumen
Score 4	Spermatogenese-Arrest bei Spermatozyten I: Keine Spermatozoen; wenige Spermatozyten I
Score 3	Arrest auf dem Niveau der Spermatogonien: Typ-A-Spermatogonien teilen sich, entwickeln sich aber nicht weiter
Score 2	Sertoli-cell-only-Symptomatik (SCO): Keine Keimzellen; nur Sertolizellen
Score 1	Komplette Tubulusatrophie: Keine Elemente des Keimepithels vorhanden (Tubulusschatten)

2.2.5.2 Entparaffinierung

Die Schnittpräparate wurden zunächst zwei Mal 5 Minuten in Xylol entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert: vergällter Ethanol (99%) für 3 Minuten, dann jeweils 5 Minuten 100%, 96%, 70% und 50% Ethanol.

Nach der Alkoholreihe folgte die Spülung in destilliertem Wasser für 10 Minuten.

2.2.5.3 Permeabilisierung

Anfangs wurde ein Puffer aus 0,1% TritonX-100 und 0,1% tri-Natriumcitrat-Dihydrat verwendet. So wurden die Zellen für 8 Minuten permeabilisiert, bevor sie wieder, wie oben beschrieben, zwei Mal 5 Minuten mit PBS gewaschen wurden.

Da die Ergebnisse nicht optimal waren, wurde ein Permeabilisierungspuffer ohne Citrat getestet. Für den direkten Vergleich wurden die Biopsien für 8 Minuten in PBS mit 0,1% TritonX-100 permeabilisiert.

Als dritten Ansatz wurden die Biopsien 25 Minuten in einen Puffer aus 20 µl/ml Proteinase K in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gegeben.

Da das Ergebnis bei allen drei Ansätzen nahezu gleich war, ohne dass eine Methode einen wesentlichen Vorteil gebracht hätte, wurde im weiteren Verlauf nur der Proteinase-K-Puffer verwendet (vgl. Abschnitt 4.3).

2.2.5.4 Positivkontrollen

Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Positivkontrollen wie bei den oben genannten Ansätzen mit 50 µl DNase I (10 µl DNase Puffer, 85 µl bidestilliertes Wasser, 5 µl DNase I) pro Biopsie 10 Minuten inkubiert. Um bessere Ergebnisse zu erzielen, wurde der DNase-Verdau bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Im Anschluss wurden die Objektträger wieder zwei Mal 5 Minuten in PBS gewaschen.

2.2.6 Ausgestrichene Hodenbiopsien

Um die Hodenbiopsien besser mit einem Spermienausstrich vergleichen zu können, sollte in einem weiteren Versuchsansatz die Paraffinierung umgangen werden. Dazu wurden die Biopsien direkt nach Entnahme für eine Stunde in IVF-Medium (SpermPrep™) gelagert, bevor sie auf einen polylysinbeschichteten Objektträger aufgetragen und ausgestrichen wurden.

Die ausgestrichenen Hodenbiopsien wurden wie das Ejakulat luftgetrocknet und anschließend in einem Ansatz in PBS mit 4% PAF und in einem anderen Ansatz mit modified Davidson's Fluid für eine Stunde fixiert. Danach wurden die Objektträger zwei Mal 5 Minuten in PBS gewaschen. Das Gewebe wurde mit einem Puffer aus 0,1% TritonX-100 und 0,1% tri-Natriumcitrat-Dihydrat für 8 Minuten permeabilisiert, bevor es erneut zwei Mal 5 Minuten mit PBS gewaschen wurden.

Die Positivkontrollen wurden unter einer Hybridisierungskammer (HybriWell™) mit 100 µl DNase I (Sigma-Aldrich®) (10 µl DNase Puffer, 85 µl bidestilliertes Wasser, 5 µl DNase I) für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Danach wurde eine neue Hybridisierungskammer auf jeden Objektträger geklebt, 100 µl TUNEL-Reaktionsmischung aus dem Anwendungspaket von Roche hineinpipettiert und bei 37°C für 60 Minuten im Wasserbad inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger ein letztes Mal in PBS gewaschen und mit einem Deckgläschen bedeckt, um im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden zu können.

2.2.7 Färbungen zur Erfassung von DNA-Fragmentierung

Es wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Farbstoffe verwendet, denen unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen.

2.2.7.1 TUNEL-Färbung

TUNEL steht für „Terminal deoxynukleotidyl-Transferase mediated dUTP nick-end labeling“. Die an den Enden fragmentierter DNA-Stränge frei werdenden 3'-OH-Gruppen können durch das Enzym TdT (Terminal deoxynukleotidyl-Transferase) mit fluoreszierenden Nukleotiden versehen werden. Es werden Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA markiert, sodass eine Grünfluoreszenz bei DNA-Fragmentierung entsteht.

Um bei DNA-Fragmentierung der Präparate die gewünschte Grünfluoreszenz zu erhalten, wurden 50 µl TUNEL-Reaktionsmischung aus dem Anwendungspaket von Roche auf jeden Objektträger pipettiert, welcher dann mit einem Deckgläschen bedeckt bei 37°C für 60 Minuten im Wasserbad gelagert wurde.

Anschließend wurden die Objektträger zwei Mal 5 Minuten in PBS gewaschen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Zum Eindecken wurde PBS verwandt, um unnötig beeinflussende Faktoren auszuschließen.

Für die Versuche mittels Bioanalyzer wurden 50 µl TUNEL-Reaktionsmischung [Roche, 2006] in jedes Reaktionsgefäß pipettiert, welche dann, wie oben beschrieben, im Wasserbad gelagert wurden. Anschließend wurde jedes Reaktionsröhrchen mit 1 ml PureSperm[®] Wash aufgefüllt und zentrifugiert.

2.2.7.2 Annexin V und Calcein-AM

Mit den Farbstoffen Annexin V und Calcein-AM lassen sich apoptotische von vitalen Zellen unterscheiden. Annexin V ist ein Marker für die Apoptoserate von Zellen. Durch Bindung des Farbstoffs an Phosphatidylserinreste, die beim Eintreten in die Apoptose von der inneren Membranseite nach außen geklappt werden, entsteht eine Rotfluoreszenz [Preckel & Luedke, 2001].

Abbildung 2.5 zeigt, wie Annexin V mit Hilfe von Ca^{2+} an Phosphatidylserin (PS) bindet, da PS unter physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen eine hohe Affinität zu Annexin V hat [Winkle *et al.*, 2007].

In der Frühphase der Apoptose ist die Zellmembran intakt, sodass Annexin V nur an das Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran binden kann. Da Annexin V durch Ca^{2+} vorzugsweise an negativ geladene Phospholipide bindet, greift es nur selten an andere Phospholipide der äußeren Lipiddoppelschicht, wie Sphingomyelin oder Phosphatidylcholin [Leschner, 2006].

Die Apoptoserate von Zellen kann also mit dem Annexin-V-Test bestimmt werden, da das Molekül durch die intakte Membran nicht auf die zytoplasmatische Seite der Zelle gelangen kann [Said *et al.*, 2006].

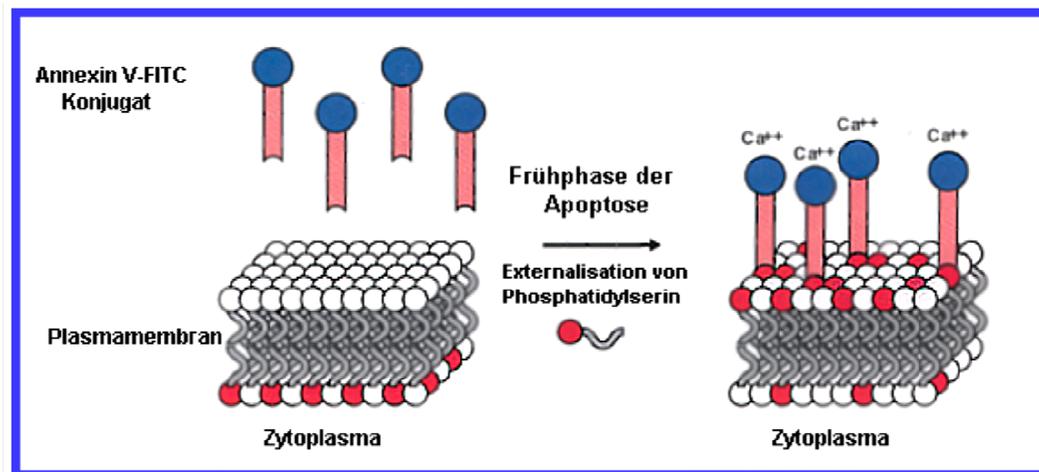


Abbildung 2.5: Funktionsweise des Annexin-V-Tests zur Darstellung von Apoptose [Leschner, 2006].

Calcein-AM ist eine zellpermeable Vorstufe, welche intrazellulär durch unspezifische Esterasen in das Substrat Calcein umgesetzt wird. Die Acetoxymethyl-Gruppe maskiert den Molekülteil, der in der Lage ist, Calciumionen zu chelatisieren, was zu einer starken Grünfluoreszenz führt. Der Komplex aus Calcein und Calciumionen verbleibt dabei in der Zelle, da er die Zellmembran nicht passieren kann [Molecular Probes, 2005].

Aufgrund der fehlenden Aktivität der Esterasen apoptotischer Zellen markiert Calcein-AM nur vitale Zellen.

Annexin V und Calcein-AM wurden nur für Versuche mittels Bioanalyzer verwendet. Die Spermien dürfen nicht fixiert oder permeabilisiert werden, um die Undurchlässigkeit der Membran zu gewährleisten. Anderenfalls könnte der Farbstoff bei nicht-apoptotischen Zellen auf der Innenseite der Membran binden.

Aus demselben Grund war keine Positivkontrolle möglich. Die Probe hätte hierfür ebenfalls permeabilisiert werden müssen, sodass viele falsche Positivmarkierungen zu erwarten gewesen wären.

2.2.8 Negativkontrollen

In dem TUNEL-Reaktionskit von Roche muss das Enzym TdT vor jedem Versuch erst zu den fluoreszierenden Nukleotiden pipettiert werden. Für Negativkontrollen wurden die Nukleotide ohne das Enzym auf den Objektträger pipettiert. Beim Waschschrift nach der Inkubation wurden alle Nukleotide wieder herausgewaschen [Roche, 2006].

2.2.9 Durchflusszytometrische Untersuchung von Spermien

Die Durchfluss- oder Flowcytometrie ist eine Technik, die es ermöglicht, gleichzeitig physikalische und molekulare Parameter auf Einzelzellniveau zu messen.

Häufig wird die Durchflusszytometrie synonym mit FACS™ verwendet. FACS™ steht für „fluorescence activated cell sorting“. Die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen strömen einzeln durch eine dünne Kapillare über einen Laserstrahl. Vom Laser angeregt, senden sie dann Lichtsignale aus, die mit Detektoren getrennt voneinander analysiert werden können. Diese Signale werden in einem Streudiagramm (Dot-Plot oder Histogramm) auf dem Monitor dargestellt [Becher, 1996]. So soll bei Spermien eine Aussage über die Qualität der Probe, den Fragmentierungsgrad oder die Apoptoserate getroffen werden können.

Allerdings kann die Durchflusszytometrie nur bei einigen 100.000 Zellen pro Probe angewendet werden, da sonst das Zellvolumen zu gering ist [Kiermer, 2005]. „FACS™-on-a-chip“, wie es mit dem Bioanalyser möglich ist, kommt mit deutlich weniger Zellen aus, da hier im Mikroliterbereich gearbeitet wird [Kiermer, 2005].

2.2.9.1 Bioanalyser

Der Bioanalyser ist ein Gerät, um DNA, RNA, Proteine und Zellen mittels Fluoreszenz zu detektieren und zu quantifizieren. Für diese Arbeit sollte die Integritätsanalyse des FACS™ mittels Bioanalyser imitiert werden.

In Abbildung 2.6 ist der Aufbau des Cell Assays von Agilent Technologies dargestellt. Der Zellchip hat mehrere kleine, runde Vertiefungen („Wells“), die an Kapillaren angeschlossen sind.

Die Zellsuspension, welche in einen spezifischen Zellpuffer von Agilent aufgenommen ist, wird in diese sechs „Wells“ pipettiert. Die restlichen beiden „Wells“, die für die Funktionsfähigkeit des

Bioanalyzers nötig sind, werden nach Anleitung mit mitgelieferten Lösungen befüllt. Die Zellen werden mit Unterdruck einzeln durch die Kapillaren in ein Sammelgefäß auf dem Chip gesaugt. Auf dem Weg durch die Kapillaren passieren sie einen Laser, der gleichzeitig blaue und rote Fluoreszenz anregt, nach Herstellerangaben aber auch grüne Fluoreszenz aus einer Mischung detektieren kann. Am Computer wird das Ergebnis der Messung im Dot-Plot sowie im Histogramm dargestellt. So kann die Anzahl der gemessenen Zellen und deren spezifische Fluoreszenz abgelesen werden.



Abbildung 2.6: Agilent 2100 Bioanalyser [Agilent: Life Sciences Newsroom, 2001].

Dot-Plot

Im Dot-Plot lassen sich zwei verschiedene Merkmale der gleichen Zelle zweidimensional in einem Koordinatensystem darstellen. Jeder Punkt steht für eine Zelle. Die Lokalisation in dem Koordinatensystem richtet sich z.B. nach der Intensität der erfassten Strahlung. Über die Dichte oder Streuung einer Punktwolke lässt sich auf die Häufigkeitsverteilung der Zellen mit den dargestellten Merkmalen schließen [Leschner, 2006].

2.2.9.2 Bioanalyser-Untersuchungen

Für die Verwendung des Bioanalyzers wurden bei jedem Ansatz die Ejakulate, wie in 2.2.1 beschrieben, aufgearbeitet. Die pelletierten Spermatozoen wurden für die TUNEL-Färbung 30 Minuten in 5 ml PBS mit 4% PAF fixiert. Das Reaktionsröhrchen wurde 5 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet wieder in PureSperm[®] Wash resuspendiert und 5 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Puffer aus 0,1% TritonX-100 und 0,1% tri-Natriumcitrat-Dihydrat für 8 Minuten permeabilisiert, bevor sie abermals mit PureSperm[®] Wash gewaschen wurden.

Positivkontrollen wurden mit 50 µl DNase I pro Reaktionsröhrchen (10 µl DNase Puffer, 85 µl bidestilliertes Wasser, 5 µl DNase I) 30 Minuten inkubiert und erneut mit PureSperm[®] Wash gewaschen.

Die Proben wurden, wie unter 2.2.7.1 beschrieben, gefärbt.

Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Überstände in den Reaktionsröhrchen abgekippt und die Zellen in Cell Buffer aus dem Cell Kit von Agilent resuspendiert. Nach der Beschickung des Cell Chip [Agilent Technologies, 2006] wurde die Messung gestartet.

Für die Färbung mittels Annexin V und Calcein-AM entfiel die Fixierung mittels PAF. Nach dem Waschen mit PureSperm[®] Wash wurde ein Aliquot der Probe in 100 µl PureSperm[®] Wash aufgenommen und mit 5 µl Annexin V aufgefüllt. Dazu wurde noch je Probe 1 µl 80fach-verdünntes Calcein-AM pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde jedes Reaktionsröhrchen mit 1 ml PureSperm[®] Wash aufgefüllt, zentrifugiert und das Pellet in Cell Buffer aus dem Cell Kit von Agilent resuspendiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 DNA-Fragmentierungsuntersuchungen an Spermienausstrichen

Die Spermienausstriche wurden mit PAF fixiert und mit TUNEL gefärbt. Pro Patient wurden ungefähr 3000 Zellen gezählt, wobei die Anzahl der fluoreszierenden Zellen notiert und später in Prozent angegeben wurde.

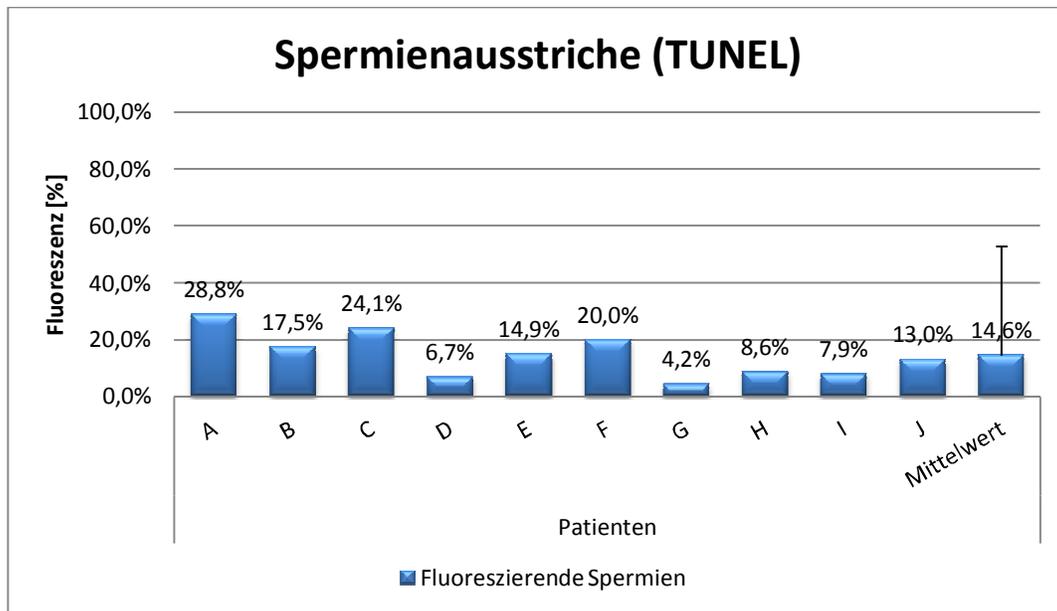


Abbildung 3.1: Fluoreszenz verschiedener PAF-fixierter und TUNEL-gefärbter Spermienausstriche einzelner Patientenproben im Vergleich zum Mittelwert (Standardabweichung = 38,2%).

Wie dem Säulendiagramm in Abbildung 3.1 zu entnehmen ist, schwankte die Fluoreszenz zwischen den einzelnen Patientenproben sehr stark. Während beim Patienten A 28,8% der Zellen fluoreszierten, waren es bei Patient G nur 4,2%. Besonders deutlich zeigte sich dieses Phänomen bei der Standardabweichung des Mittelwertes, welche durch den Fehlerbalken in dem obigen Säulendiagramm dargestellt wurde ($SD=38,2\%$). Abbildung 3.2 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Bilder von vier ausgewählten Ausstrichen der Patientenproben aus Abbildung 3.1.

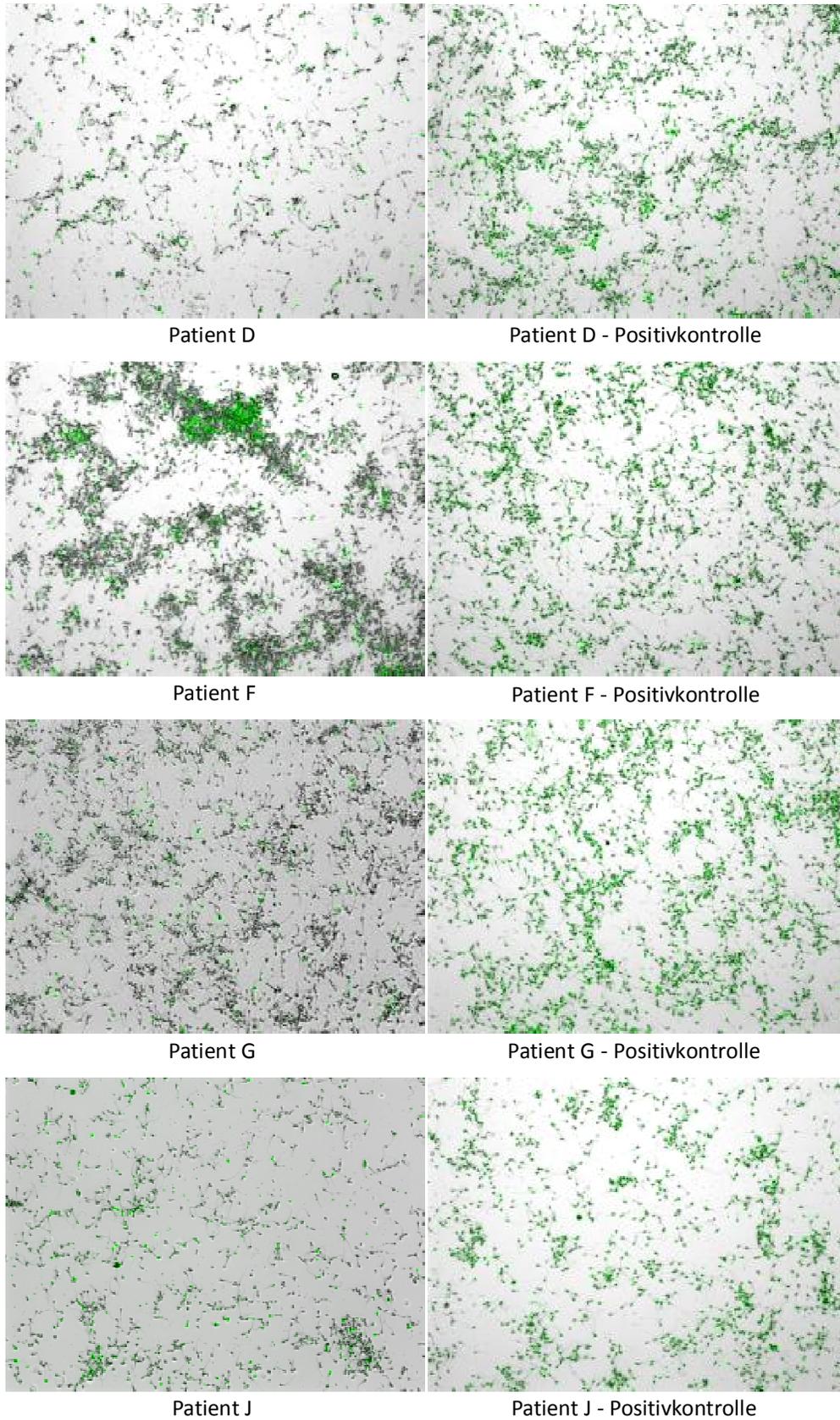


Abbildung 3.2: Exemplarische Spermienausstriche von vier Patienten aus Abbildung 3.1 jeweils mit deren Positivkontrolle.

Es gab auch Ejakulate mit vielen fluoreszierenden Zellen im Ausstrich. Bei einigen dieser Ausstrichen war jedoch in der Positivkontrolle weniger Fluoreszenz zu beobachten als in der eigentlichen Probe (Abbildung 3.3). In solchen Ausstrichen waren die Fluoreszenzbilder mit und ohne DNase-Verdau sehr ähnlich (Abbildung 3.4). Es waren keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen. (Abbildung 3.5).

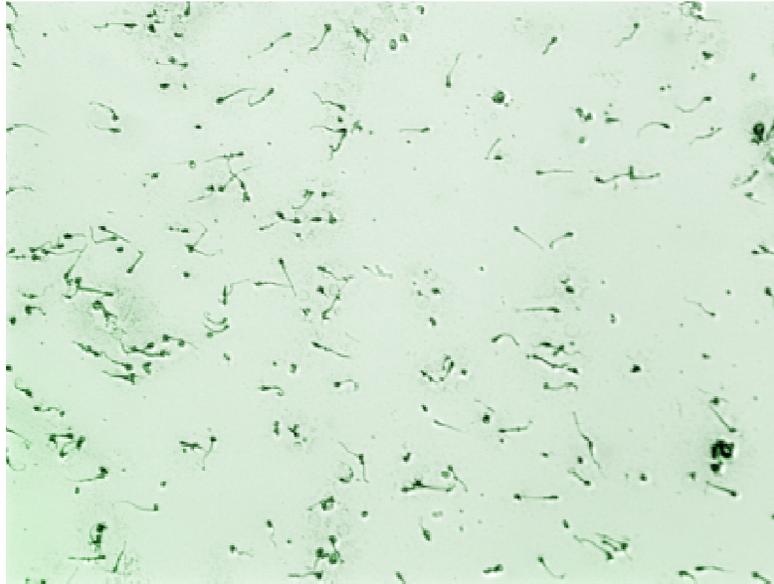


Abbildung 3.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Positivkontrolle, bei der keine Zelle deutlich fluoreszierte.

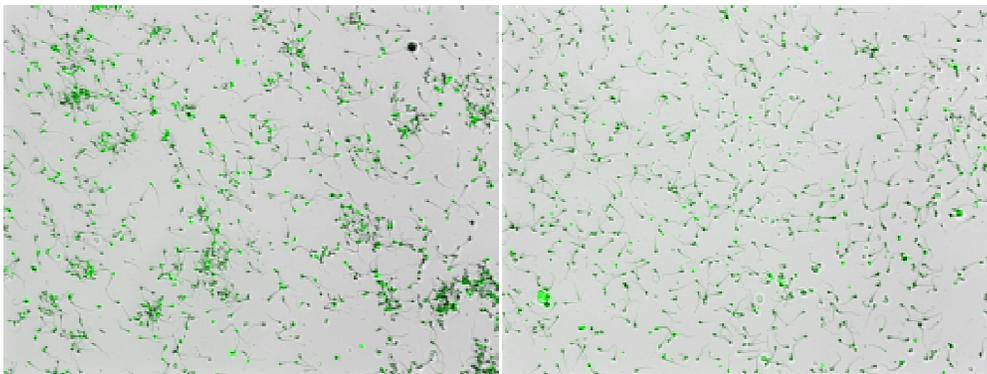


Abbildung 3.4: Vergleich zweier Spermienausstriche desselben Patienten ohne vorangegangenen DNase-Verdau (links) und mit vorangegangenem DNase-Verdau, Positivkontrolle (rechts).

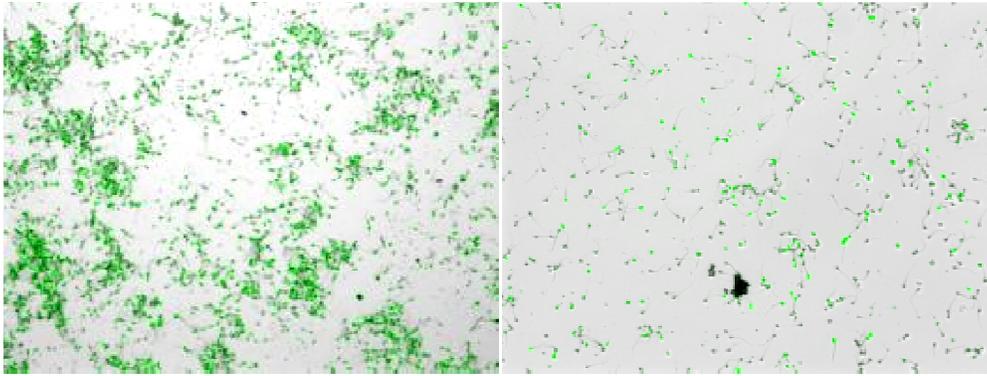


Abbildung 3.5: Vergleich zweier Spermienausstriche desselben Patienten ohne vorangegangenen DNase-Verdau (links) und mit vorangegangenem DNase-Verdau, Positivkontrolle (rechts).

3.2 Spermienfixierung mittels Cytospin®

Um die O₂-Exposition auf die Zellen zu minimieren und so nach Möglichkeit einen Risikofaktor für DNA-Fragmentierung eliminieren zu können, wurde versucht, die Zellen mittels Cytospin® auf Objektträgern zu fixieren (vgl. Abschnitt 2.2.4).

Wie sich jedoch herausstellte, eignete sich diese Methode aufgrund der fixierungsbedingt erforderlich hohen Rotationsgeschwindigkeit nicht sonderlich gut. Bedingt durch den Cytospin®-Aufbau waren die Zellen mikroskopisch nur schlecht analysierbar, da sie sich auf ein sehr kleines Areal des Objektträgers konzentrierten und dort teilweise in mehreren Schichten übereinander lagen. Das machte die Auswertung der Fluoreszenz einzelner Zellen ungenau. Wurden die Proben verdünnt, waren in der Regel nicht genügend Spermien für eine statistische Auswertung auf diesem kleinen Areal zu finden.

In Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse zweier Versuche dargestellt. Verglichen wurde der Unterschied in der Fluoreszenz zwischen einem Ausstrich und dem Cytospin® jeweils bei den Fixativa mDF und PAF. Das Ergebnis deutete darauf hin, dass mit der Fixierung durch mDF im Cytospin® mehr Fluoreszenz nachzuweisen war als im Ausstrich. Bei der Fixierung mit PAF war die Differenz zwischen der Fluoreszenz im Ausstrich gegenüber mittels Cytospin® fixierten Zellen geringer (Abbildung 3.7, Abbildung 3.8). Für eindeutige Ergebnisse waren jedoch zu wenig Versuchsdurchläufe auswertbar, sodass die Standardabweichung sehr hohe Werte aufweist (SD (Ausstrich/mDF) = 21,5%; SD (Ausstrich/PAF) = 27,0%; SD (Cytospin®/mDF) = 30,7%; SD (Cytospin®/PAF) = 30,1%; bei jeweils n=2).

Der p-Wert im T-Test nach Student war weder für die Fixierung mit mDF noch mit PAF signifikant ($p = 0,09567$ für die Fixierung mit mDF; $p = 0,5398$ für die Fixierung mit PAF).

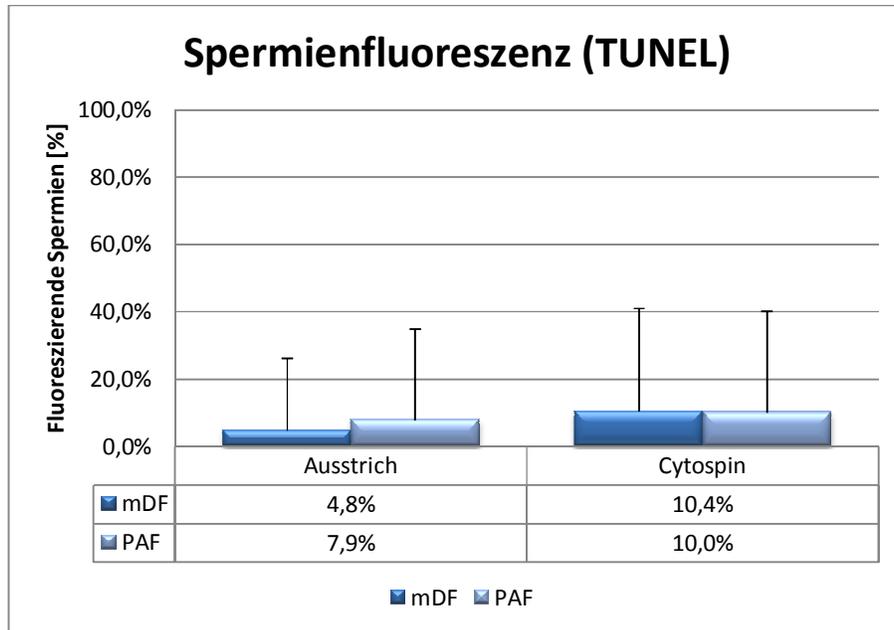


Abbildung 3.6: Vergleich der Spermienfluoreszenz auf luftgetrockneten Spermienausstrichen im Gegensatz zu durch Cytospin[®] fixierten Zellen jeweils mit zwei unterschiedlichen Fixativa.

Es zeigte sich also, dass die Spermienfixierung mittels Cytospin[®] für die hier angewendeten Versuche ungeeignet war.

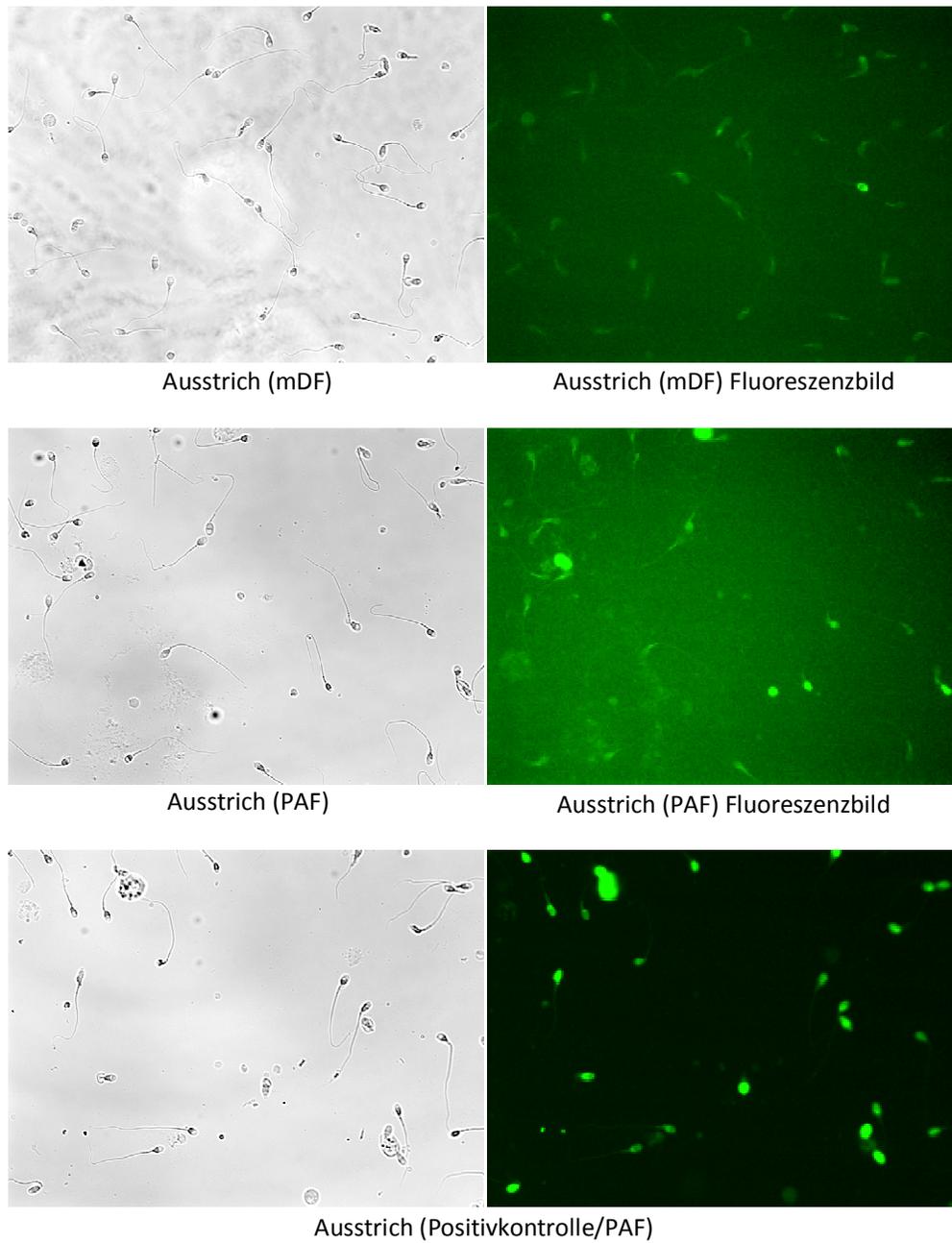


Abbildung 3.7: Auflicht- und Fluoreszenzmikroskopie von unterschiedlich fixierten Ausstrichpräparaten sowie einer Positivkontrolle (PAF).

Abbildung 3.7 veranschaulicht im Vergleich mit Abbildung 3.8, dass ausgestrichene Spermien in geringerem Maße fluoreszieren als Spermien desselben Ejakulates, welche mittels Cytospin fixiert worden sind.

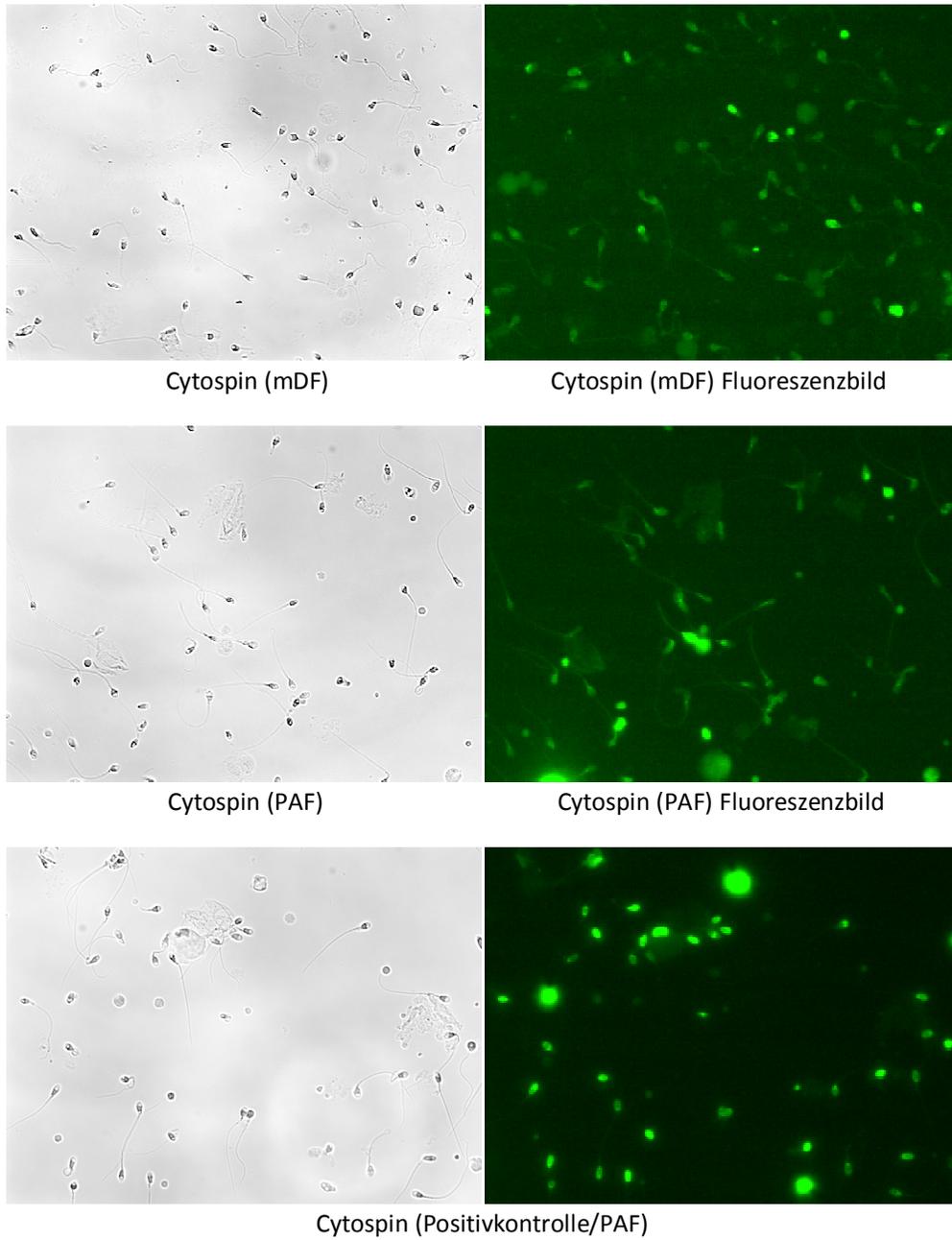
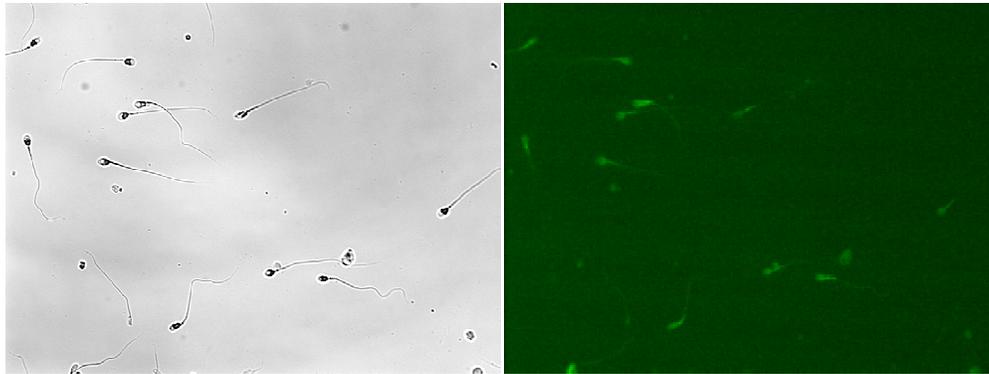


Abbildung 3.8: Auflicht- und Fluoreszenzmikroskopie von unterschiedlich fixierten Präparaten, welche mittels Cytospin[®] erzeugt wurden.

In Abbildung 3.9 ist das auflicht- sowie fluoreszenzmikroskopische Bild einer Negativkontrolle dargestellt. Es zeigt sich die Tendenz zur Eigenfluoreszenz der Spermien.



Negativkontrolle

Abbildung 3.9: Exemplarische Darstellung einer Negativkontrolle aus den Versuchen mittels Cytospin[®].

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Fixierung durch Cytospin[®] zur Untersuchung von Spermien-DNA ungeeignet ist.

Durch eine genaue Verdünnungsreihe kann eventuell die exakte Spermienkonzentration titriert werden, die eine Untersuchung der DNA-Integrität ermöglicht. Die während der Fixierung wirkende Zentrifugalkraft könnte jedoch das Ergebnis verfälschen. In den Versuchen mittels Bioanalyzer, welche im Abschnitt 3.6 bewertet werden, hatte sich gezeigt, dass eine hohe Rotationsgeschwindigkeit die Spermien beschädigt.

3.3 Vergleich unterschiedlicher Fixativa

Zum Vergleich der Spermienausstriche mit den Schnittpräparaten der Hodenbiopsien mussten die beiden verwendeten Fixativa mDF und PAF im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität für die Signalgebung überprüft werden (Abbildung 3.10). Da neuere Untersuchungen gezeigt haben, dass modified Davidson's Fluid (mDF) für die Gewebefixierung der Bouin'schen Lösung überlegen ist, wurde mDF für alle Hodenbiopsien als Fixativum gewählt. Modified Davidson's Fluid ist gewebeschonender und führt in den Tubuli seminiferi bei Erhaltung der Morphologie zu weniger Schrumpfungartefakten [Latendresse *et al.*, 2002].

Die Fixierung mit Paraformaldehyd ist wiederum in den meisten Protokollen für Spermienausstriche und auch in dem Nutzungshandbuch für das „In Situ Cell Death Detection Kit“ [Roche, 2006] empfohlen.

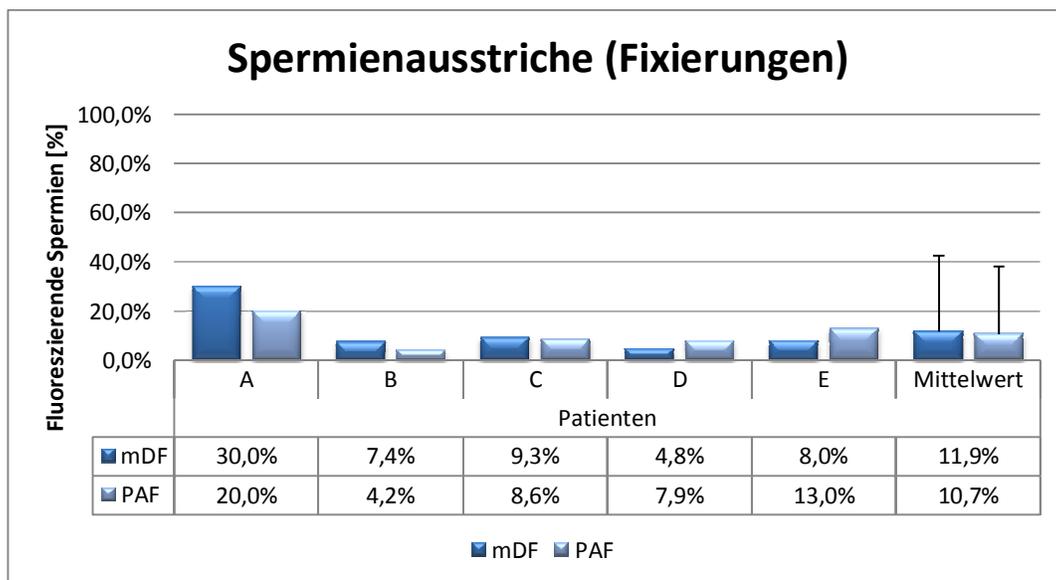


Abbildung 3.10: Vergleich der Spermienfluoreszenz in Ausstrichen bei unterschiedlichen Fixierungen.

Das in Abbildung 3.10 dargestellte Resultat zeigt, dass die Differenz der fluoreszierenden Spermien zwischen beiden Fixierungen mit nur 1,2% sehr gering ist. Der Mittelwert der fluoreszierenden Spermien für die Fixierung mittels mDF beträgt 11,9%, während mittels PAF fixierte Zellen im Durchschnitt zu 10,7% fluoreszieren. Diese Differenz ist nach Durchführung des T-Tests nicht signifikant ($p=0,1945$). Auch wenn die Standardabweichungen der Mittelwerte sehr groß sind ($SD(mDF) = 30,9\%$; $SD(PAF) = 27,7\%$), konnten die in mDF fixierten Hodenbiopsien also mit den PAF-fixierten Spermienausstrichen verglichen werden.

3.4 Hodenbiopsien

Die zu untersuchenden Hodenbiopsien wurden nach 24-stündiger Fixierung in mDF in Paraffin eingebettet. Diese Einbettung stellte den wesentlichen Unterschied zu der Behandlung der Ejakulate dar, da dieser Schritt nicht imitiert werden konnte.

Die Fluoreszenz in den Säulendiagrammen ist zur besseren Veranschaulichung wie bei den Spermienausstrichen in Prozent angegeben. Zu unterscheiden ist jedoch die Zählweise. Während bei den Ausstrichen die Prozentzahl der fluoreszierenden Spermien angegeben ist, ist bei den Biopsien die Prozentzahl der angeschnittenen Tubuli angegeben, in denen eine Zelle der angegebenen Keimzellart fluoresziert. Bei einem Prozentwert von 1 fluoreszierte also in 1% aller Tubuli eine einzige Zelle, während bei einem Wert von 100% in jedem Tubulus eine Keimzelle leuchtete (Abbildung 3.11). Diese Zählart war vertretbar, da in der Regel maximal ein bis zwei Keimzellen/Tubulus fluoreszierten. In den meisten Tubuli war jedoch keine fluoreszierende Keimzelle zu finden.

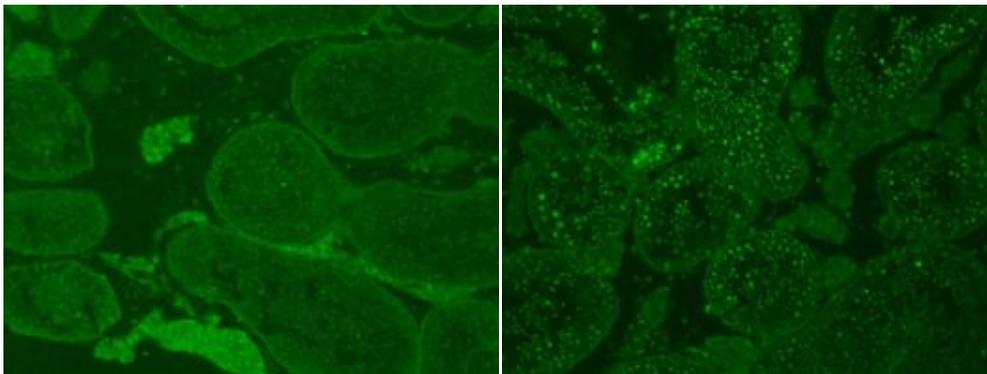


Abbildung 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer TUNEL-gefärbten Hodenbiopsie mit fluoreszierender Keimzelle im Tubuluslumen (links), Positivkontrolle (rechts).

3.4.1 Fluoreszenz am Beispiel des mJ-Score 10

Vor der Beurteilung der Fluoreszenz wurden jeweils die zur Biopsie gehörenden, mit H.E. gefärbten Kontrollschnitte (Abbildung 3.12) für einen späteren Vergleich nach dem mJ-Score (Kapitel 2.2.5.1) klassifiziert. Anschließend wurde das Ergebnis der TUNEL-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und quantifiziert (Abbildung 3.13).

Bei einem mJ-Score 10 sind aufgrund vollständiger Spermatogenese die Keimzellen jedes Stadiums in ausreichender Anzahl im Präparat vorhanden. Aus diesem Grund eignet sich dieser Score besonders für eine Gegenüberstellung der Fluoreszenz der einzelnen Zellklassen sowie zum Vergleich mit der mittleren Fluoreszenz im Ejakulat.

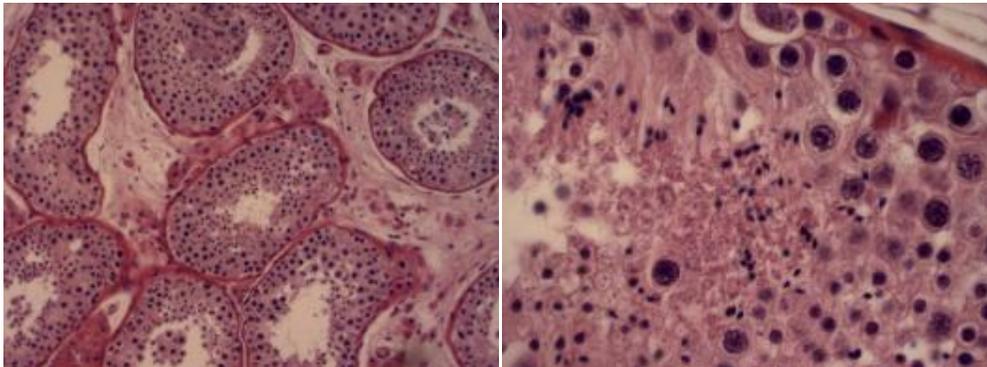


Abbildung 3.12: Lichtmikroskopische Aufnahme H.E.-gefärbter Tubuli seminiferi eines Patienten mit einem mJ-Score 10 (links), Vergrößerung eines Tubulus (rechts).

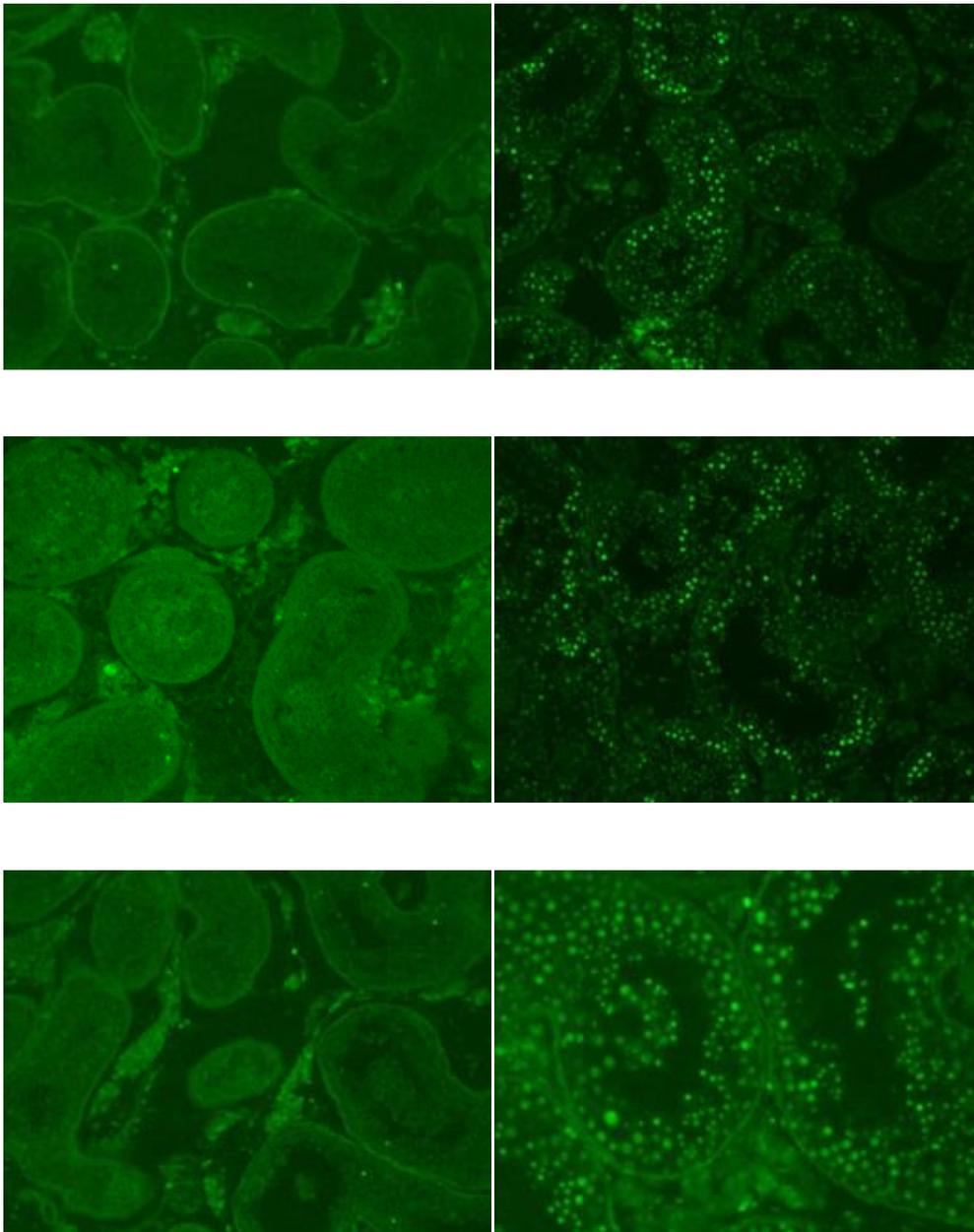


Abbildung 3.13: Fluoreszenzmikroskopie von Präparaten aus Biopsien dreier mJ-Score-10-Patienten (links ohne DNase) mit jeweiliger Positivkontrollen (rechts mit DNase).

Abbildung 3.13 zeigt, wie gering die Anzahl fluoreszierender Spermien in einer Hodenbiopsie mit intakter Spermatogenese ist.

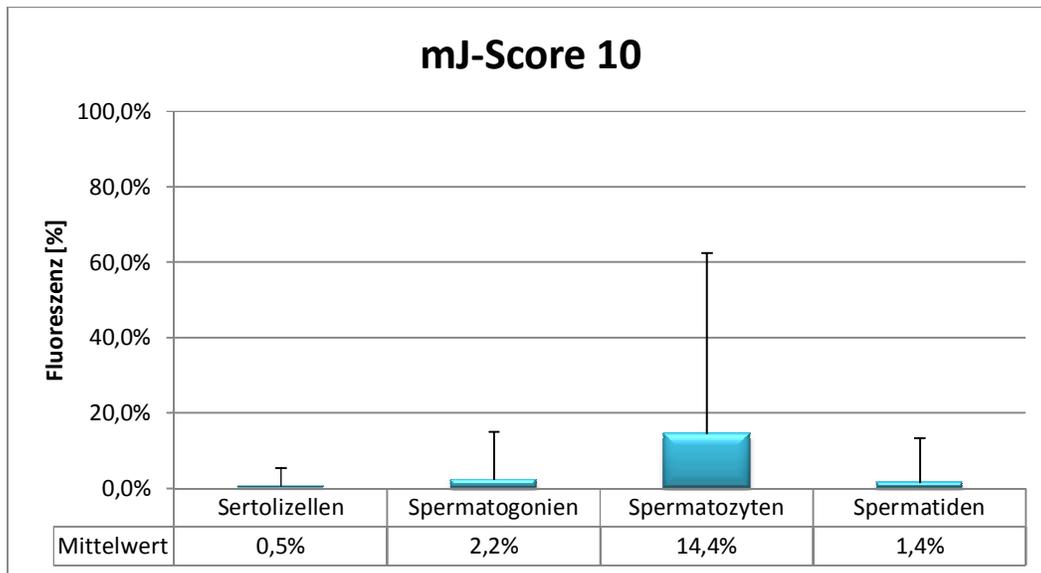


Abbildung 3.14: Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenz einzelner Zellklassen (eine fluoreszierende Zelle/angeschnittenen Tubulus) bei Patienten mit einem mJ-Score 10 (n=6).

Abbildung 3.14 ist zu entnehmen, dass die somatischen, postmitotisch fixierten Sertolizellen äußerst selten fluoreszierten (SD (Sertolizellen) = 4,9%).

Die Spermatozyten fluoreszierten mit einer Zelle in 14,4% der Tubuli am meisten (SD = 48,1%), während die Fluoreszenz der Spermatogonien und der Spermatiden mit 2,2% und 1,4% deutlich niedriger war (SD (Spermatogonien) = 12,8%; SD (Spermatiden) = 11,9%).

Nach dem Überblick in Abbildung 3.14 gewähren die Abbildungen 3.15 – 3.18 eine detailliertere, zelltypbezogene Aufschlüsselung der Einzelresultate.

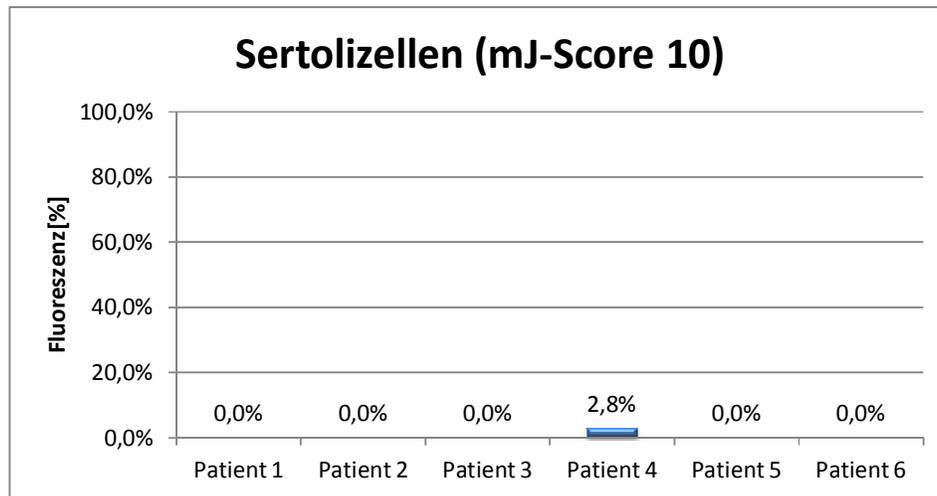


Abbildung 3.15: Fluoreszenz der Sertolizellen bei verschiedenen Patienten mit einem mJ-Score 10.

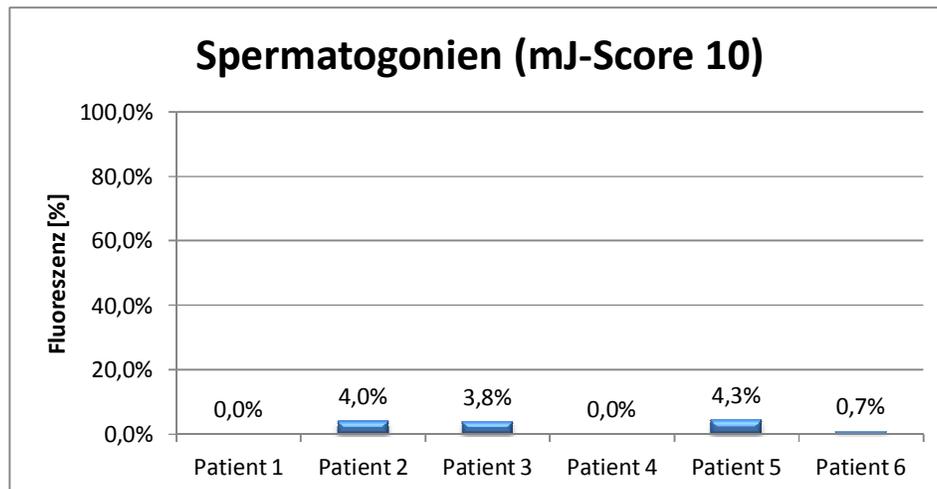


Abbildung 3.16: Fluoreszenz der Spermatogonien bei verschiedenen Patienten mit einem mJ-Score 10.

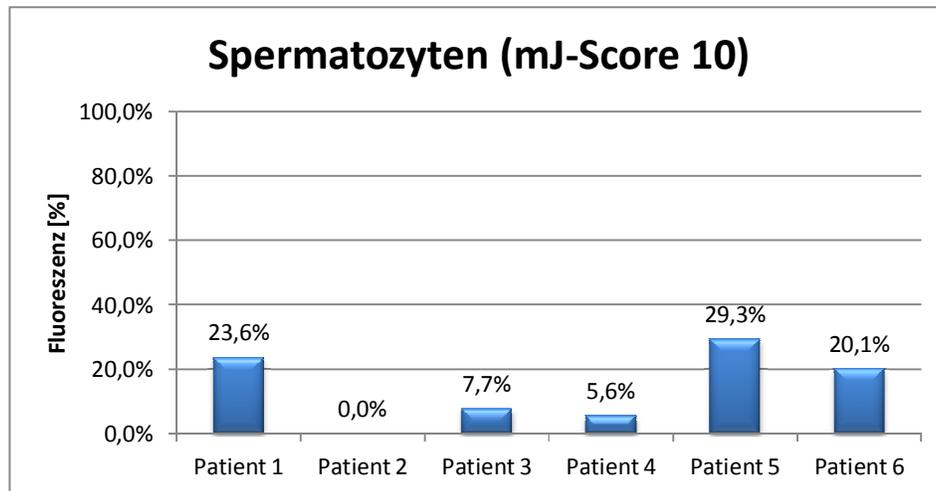


Abbildung 3.17: Fluoreszenz der Spermatozyten bei verschiedenen Patienten mit einem mJ-Score 10.

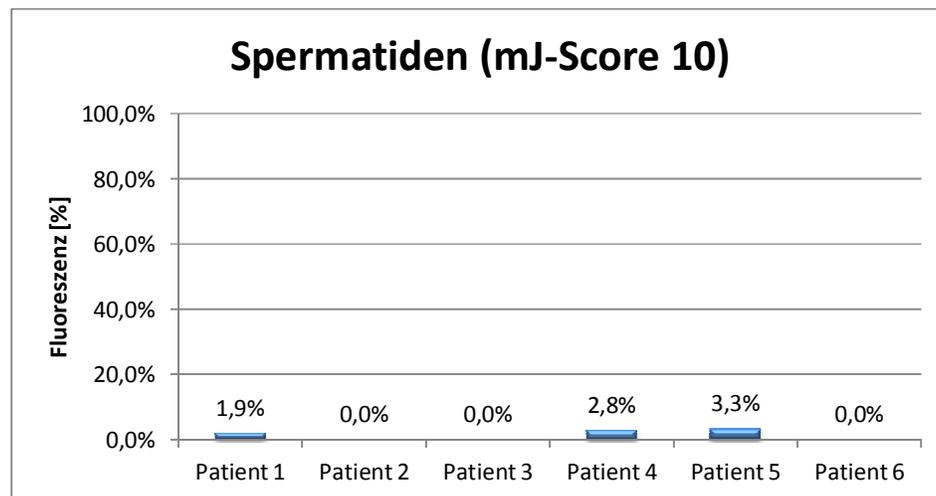


Abbildung 3.18: Fluoreszenz der Spermatiden bei verschiedenen Patienten mit einem mJ-Score 10.

Die Abbildungen 3.15 – 3.18 verdeutlichen die geringe Fluoreszenz aller Zellen des Keimepithels. Insbesondere bei Sertolizellen, Spermatogonien und Spermatiden war nahezu keine Fluoreszenz nachweisbar. Auch die Schwankungen zwischen den einzelnen Patientenproben waren äußerst gering. Bei den Spermatozyten fluoreszierten in der Regel deutlich mehr Zellen als in den anderen Gruppen. Allerdings war hier auch eine größere prozentuale Differenz zwischen den einzelnen Hodenbiopsien festzustellen.

Verglichen mit den ejakulierten Spermien leuchtete in einer Hodenbiopsie allerdings kaum eine Zelle. Es handelt sich um eine andere Zählweise, sodass 14% Fluoreszenz

auf einem Spermienausstrich nicht mit dem Mittelwert der Fluoreszenz bei Spermatozyten des mJ-Score 10 gleichgesetzt werden kann. Es konnte also festgestellt werden, dass die Fluoreszenz von Keimzellen einer Hodenbiopsie deutlich geringer ist als die ejakulierter Spermien.

3.4.2 Vergleich der einzelnen mJ-Scores

Um festzustellen, ob diese Aussage, die sich auf den mJ-Score 10 bezieht, für alle mJ-Scores gilt, wurden mehrere Patienten, mit „reinen“ Scores in deren Hodenbiopsien, miteinander verglichen (Abbildung 3.19). Damit sind Biopsien gemeint, die einem einzigen mJ-Score zuzuordnen sind.

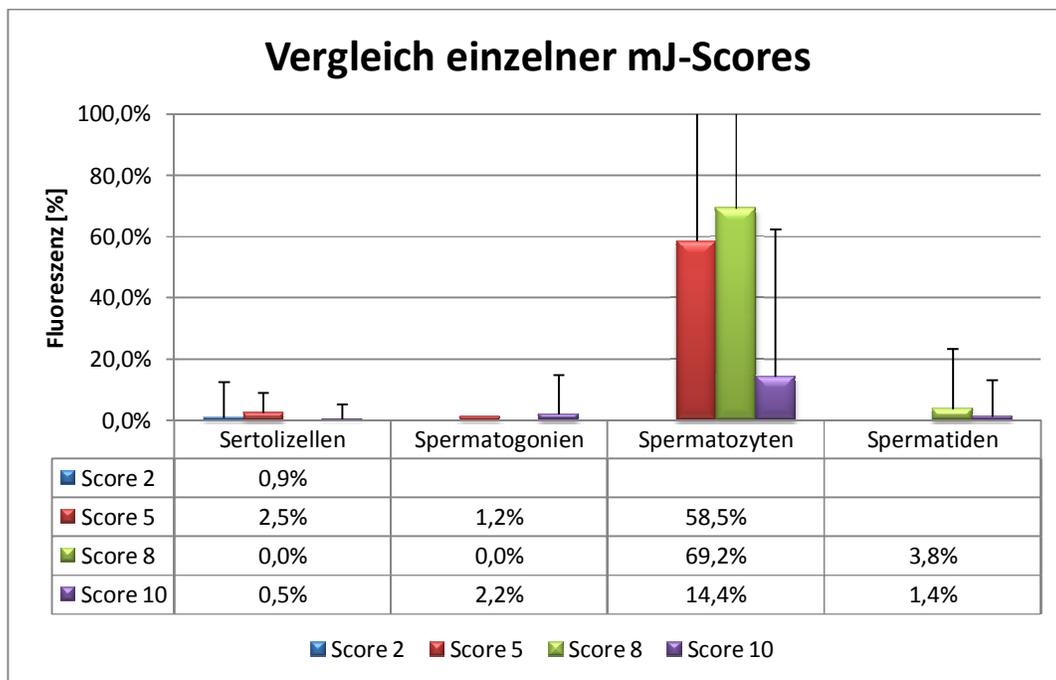


Abbildung 3.19: Veranschaulichung der Fluoreszenz der unterschiedlichen Zellen des Keimepithels im Vergleich einzelner mJ-Scores mit Standardabweichung.

In Abbildung 3.19 sind die Mittelwerte von mJ-Score-2-Patienten (n=4), mJ-Score-5- (n=2), mJ-Score-8- (n=2) und den oben dargestellten mJ-Score-10-Patienten (n=6) gegenübergestellt. Es werden die einzelnen Zellklassen verglichen.

Bei einem mJ-Score 2 (Abbildung 3.20) sind nur Sertolizellen in einem Tubulus vorhanden (Sertoli-cell-only-Symptomatik (SCO)), sodass bei diesen Patienten Keimzellfluoreszenz fehlte. Mit diesem Score sollte nachgewiesen werden, dass der Schnitt bei einem SCO nicht mehr fluoreszierende Sertolizellen enthält als bei anderen

mJ-Scores (SD (Score 2/Sertolizellen) = 11,9%). Es zeigte sich, dass in jedem mJ-Score, auch dem Score 2, fast keine Fluoreszenz nachweisbar war (SD (Score 5/Sertolizellen) = 6,6%; SD (Score 8/Sertolizellen) = 0%; SD (Score 10/Sertolizellen) = 4,9%).

In diesem Vergleich (Abbildung 3.19) fiel wieder die deutlich höhere Fluoreszenz der Spermatozyten auf. Es fluoreszierten deutlich mehr Spermatozyten als Spermatogonien oder Spermatischen.

Es zeigte sich darüber hinaus, dass bei abnehmendem mJ-Score die Anzahl fluoreszierender Spermatozyten stieg. So fluoreszierte bei einem Score 5 in durchschnittlich 58,5% der Tubuli eine Spermatozyte (SD = 175,4%) (Abbildung 3.21) und bei einem Score 8 sogar 69,2% (SD = 115,8%) (Abbildung 3.22), während bei einem Score 10, welcher die intakte Spermatozyten darstellt (Abbildung 3.23), nur in 14,4% der Tubuli eine Spermatozyte fluoreszierte (SD = 48,1%).

Zur Verifizierung dieses Trends ist allerdings noch eine größere Probenzahl erforderlich.

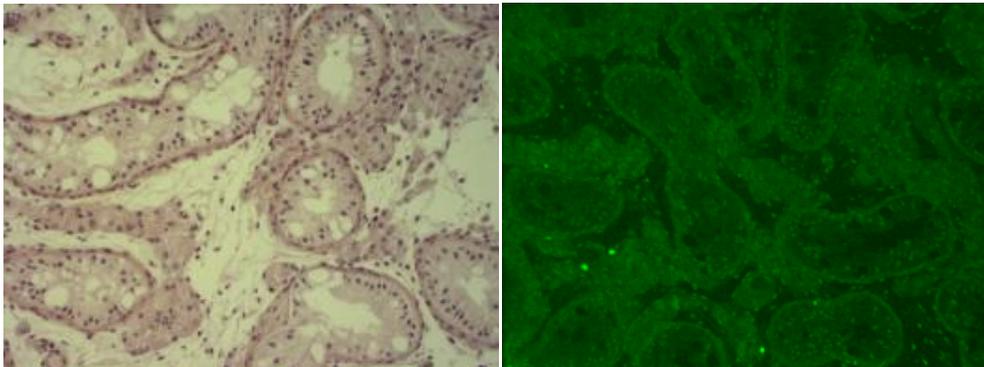


Abbildung 3.20: mJ-Score 2 (links: H.E.-Kontrollschnitt; rechts: Fluoreszenzmikroskopie).

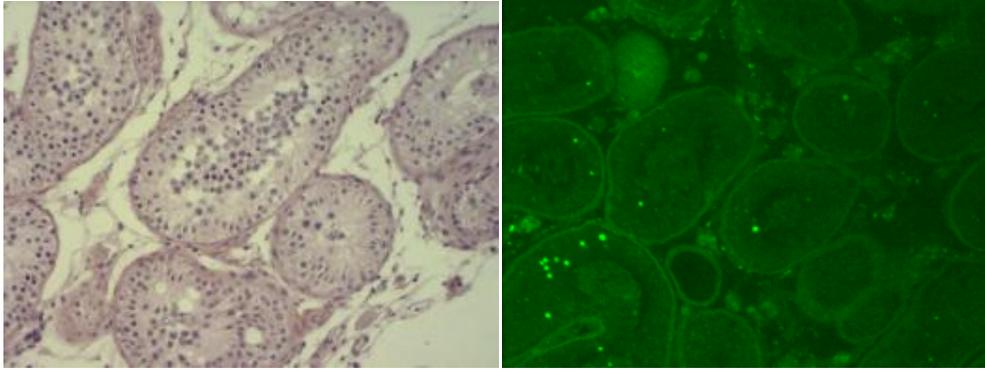


Abbildung 3.21: mJ-Score 5 (links: H.E.-Kontrollschnitt; rechts: Fluoreszenzmikroskopie).

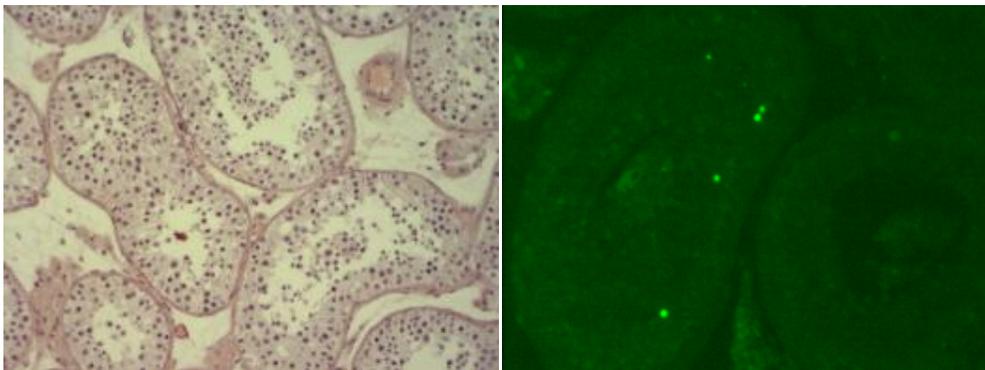


Abbildung 3.22: mJ-Score 8 (links: H.E.-Kontrollschnitt; rechts: Fluoreszenzmikroskopie).

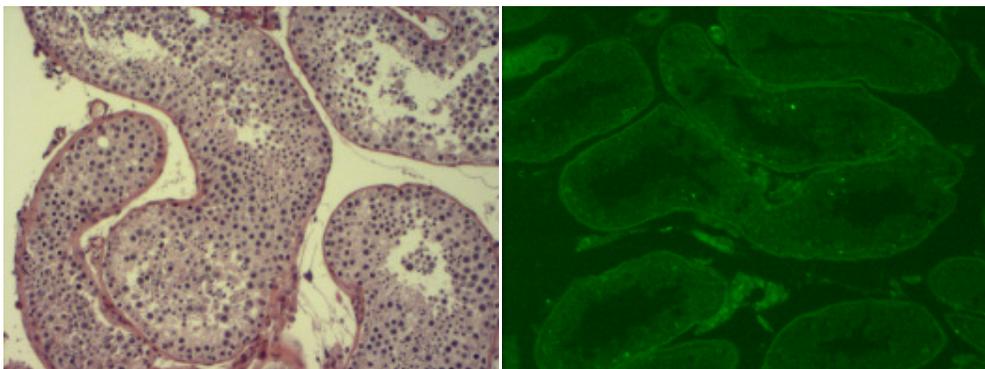


Abbildung 3.23: mJ-Score 10 (links: H.E.-Kontrollschnitt; rechts: Fluoreszenzmikroskopie).

3.4.3 „Mixed Atrophy“

„Mixed Atrophy“ [Sigg & Hedinger, 1981] kennzeichnet einen pathologischen Status des Hodengewebes, bei dem mehrere Tubuli unterschiedlicher mJ-Scores im Schnittpräparat nachweisbar sind.

Ausgewählt wurden Patientenproben mit einer „Mixed Atrophy“ der mJ-Scores acht, vier und zwei, da diese sich im Nativpräparat sowie im Fluoreszenzmikroskop gut differenzieren lassen (Abbildung 3.24).

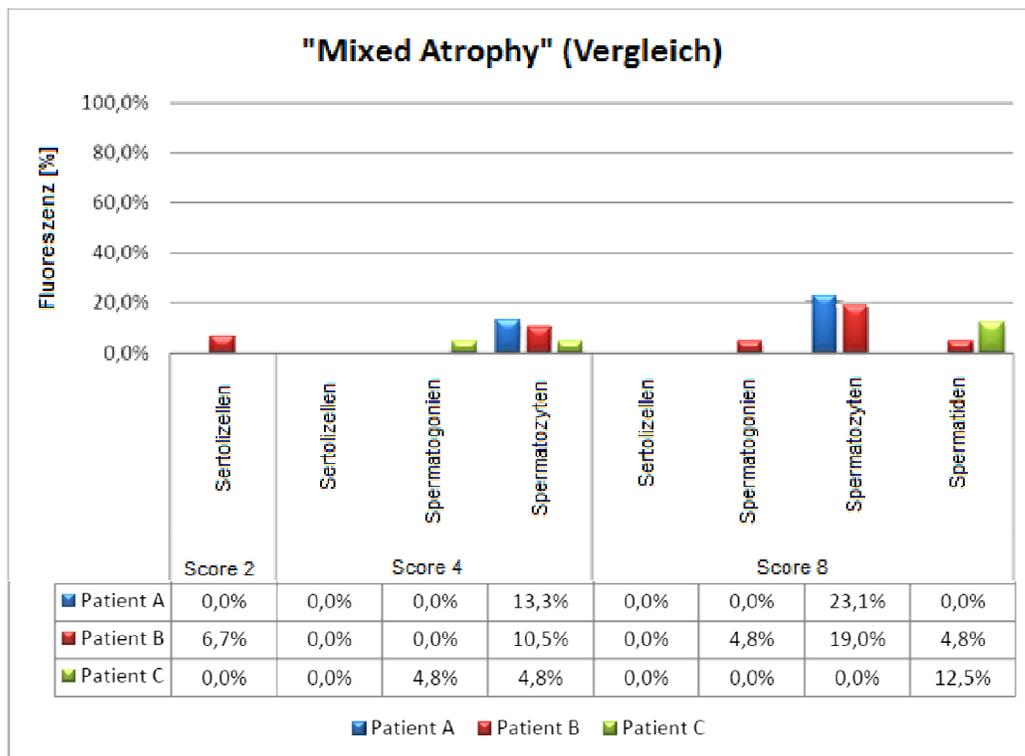


Abbildung 3.24: „Mixed Atrophy“ (mJ-Score 8, 4, 2). Illustrierung der Fluoreszenz der einzelnen Zellen des Keimzellepithels in den mit unterschiedlichem mJ-Score-benoteten Tubuli und der Streuung zwischen einzelnen Patientenproben.

Durch diesen Versuch bestätigte sich die Hypothese, dass Spermatozyten am häufigsten fluoreszieren. Sertolizellen, Spermato gonien und auch Spermato den weisen nur sehr selten Fluoreszenz auf (Abbildung 3.24).

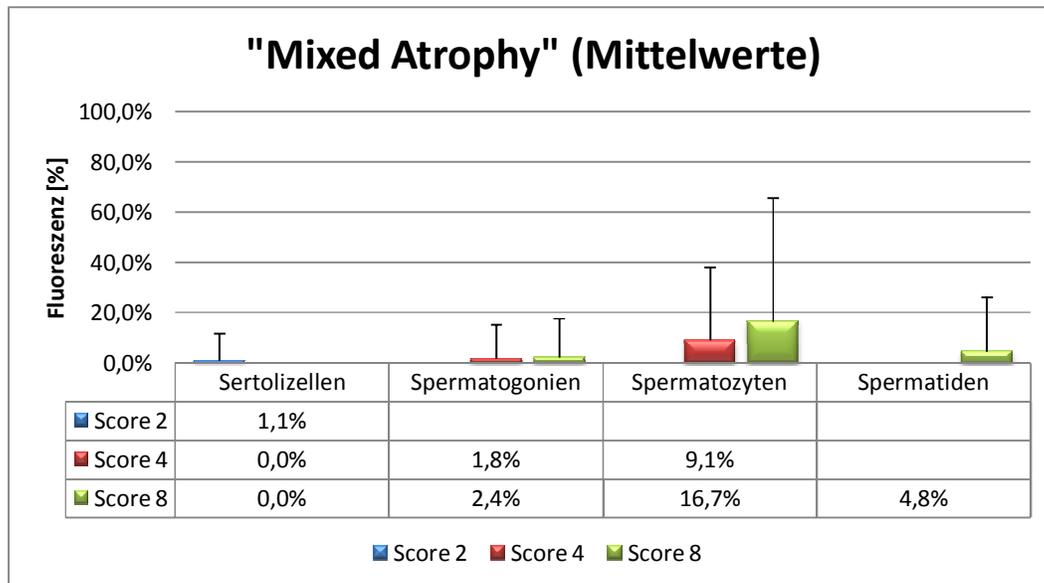


Abbildung 3.25: Mittelwerte der Patientendaten aus Abbildung 3.24 mit jeweiliger Standardabweichung (n=3).

Die gemittelten Werte der Ergebnisse aus Abbildung 3.24 machen deutlich, wie gering der Anteil fluoreszierender Keimzellen in einer Hodenbiopsie war (Abbildung 3.25). Die Standardabweichungen, insbesondere die der Spermatozyten ($SD(\text{Score } 4/\text{Spermatozyten}) = 29,0\%$; $SD(\text{Score } 8/\text{Spermatozyten}) = 49,0\%$), sind zwar wieder sehr groß, dennoch zeigen diese Ergebnisse einen deutlichen Unterschied zum Spermienausstrich.

Es müssen für eine größere Signifikanz jedoch mehr Proben untersucht werden, da in der Spermatozytenfluoreszenz der reinen mJ-Scores im Vergleich zur „Mixed Atrophy“ eine deutliche Differenz zu finden ist. Bei einem reinen mJ-Score 8 fluoreszierte in $69,2\% \pm 115,8\%$ der Tubuli eine Spermatozyte (Abbildung 3.19), während in den Score-8-Tubuli der „Mixed Atrophy“ nur in $16,7\% \pm 49,0\%$ eine Spermatozyte fluoreszierte (Abbildung 3.25).

Es bleibt herauszufinden, ob dieser Trend nur durch die geringe Probenzahl zu begründen ist, oder ob dieses Phänomen bei einer „Mixed Atrophy“ häufiger vorliegt.

3.5 Ausgestrichene Hodenbiopsien

Die Zellen im histologischen Präparat einer Hodenbiopsie fluoreszierten deutlich seltener als Spermien eines Ejakulates in Ausstrichpräparaten. Um hierüber weitere Aufschlüsse zu bekommen, wurde in einem weiteren Ansatz versucht, beide Proben exakt gleich zu behandeln (d.h. Verzicht auf die Paraffineinbettung bei der Hodenbiopsie; Abbildung 3.26).

So wurden Hodenbiopsien nach Entnahme jeweils in mDF und PAF für eine Stunde fixiert und anschließend auf einem Objektträger ausgestrichen. Dieses erwies sich jedoch als technisch problematisch, da in Abhängigkeit von der Gewebeskonsistenz stets größere Zellkonglomerate vorhanden waren (Abbildung 3.31).

Für die Färbung war dieses sehr ungünstig, da der Farbstoff auch durch mehrere Waschschriffe nicht aus dem Gewebe entfernt werden konnte und die Fluoreszenz nicht nur auf Zellen beschränkt war. Zudem fluoreszierten sehr viel mehr Zellen als erwartet (Abbildung 3.27, Abbildung 3.29), sodass davon ausgegangen werden musste, dass Gewebselemente der Hodenbiopsie durch die Manipulation alteriert worden waren.

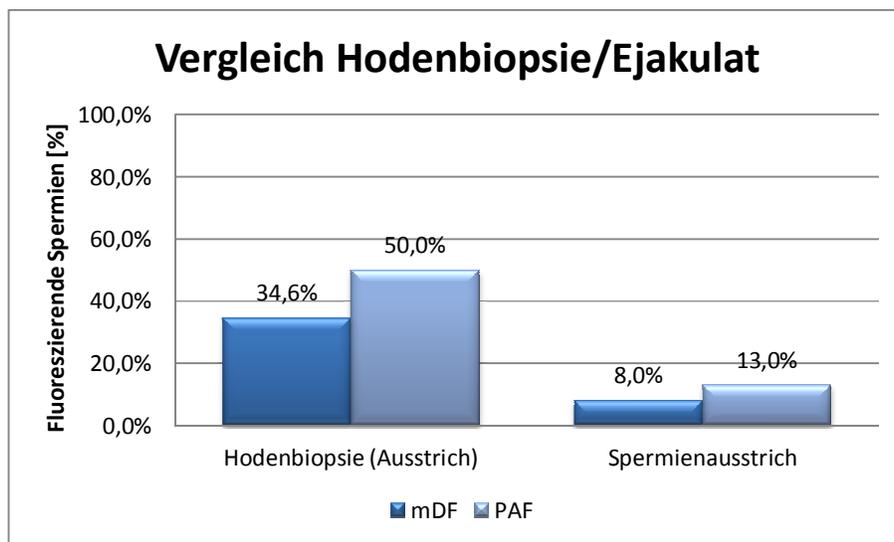


Abbildung 3.26: Fluoreszenz (mit TUNEL-Färbung) bei einem Spermienausstrich aus einem Patientenejakulat im Vergleich zur Fluoreszenz bei einer ausgestrichenen Hodenbiopsie direkt nach Entnahme (n=1).

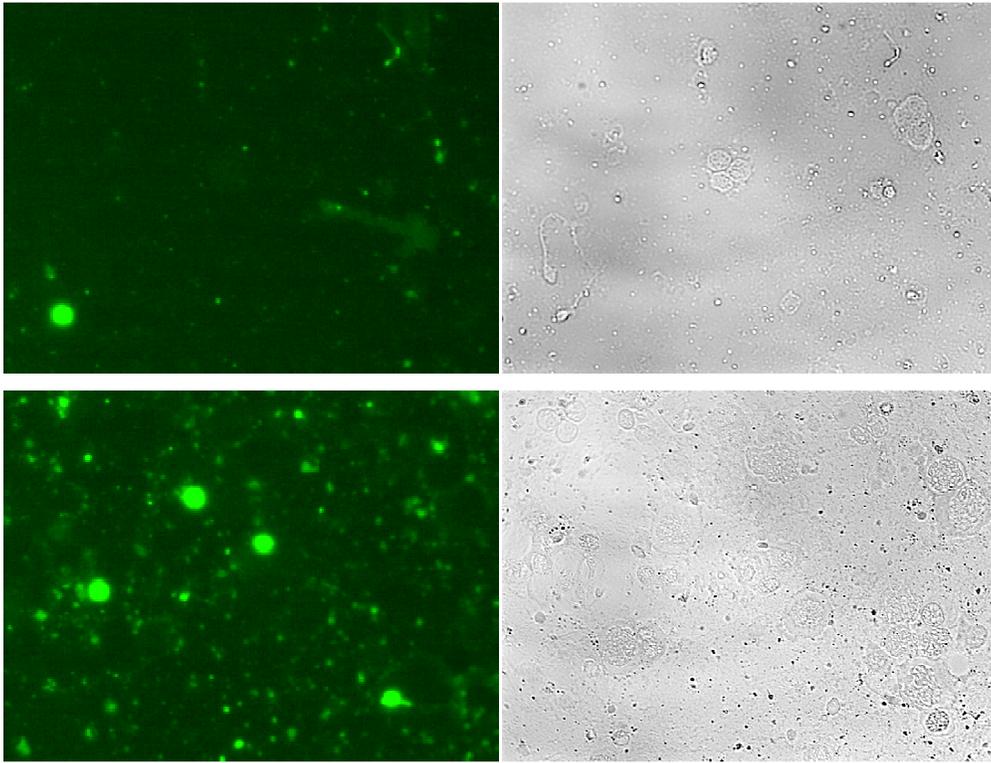


Abbildung 3.27: Ausgestrichene, mDF fixierte Hodenbiopsie. Links: Fluoreszenzbild; rechts: lichtmikroskopische Aufnahme zur Kontrolle.

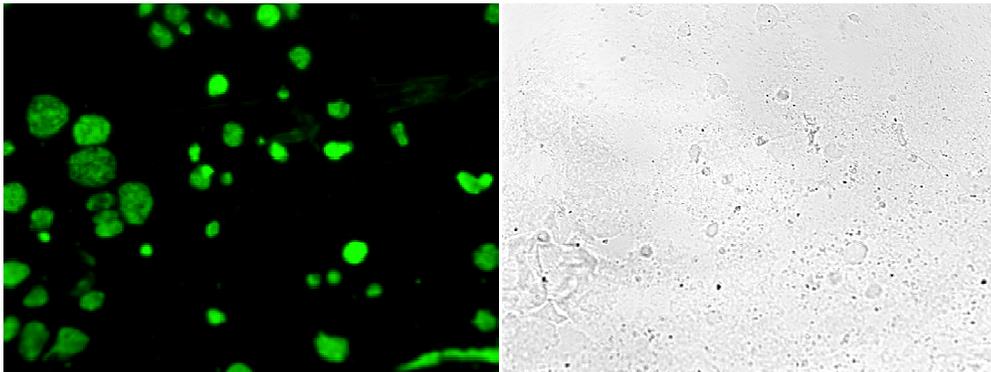


Abbildung 3.28: Ausgestrichene, mDF fixierte Hodenbiopsie (Positivkontrolle). Links: Fluoreszenzbild; rechts: lichtmikroskopische Aufnahme zur Kontrolle.

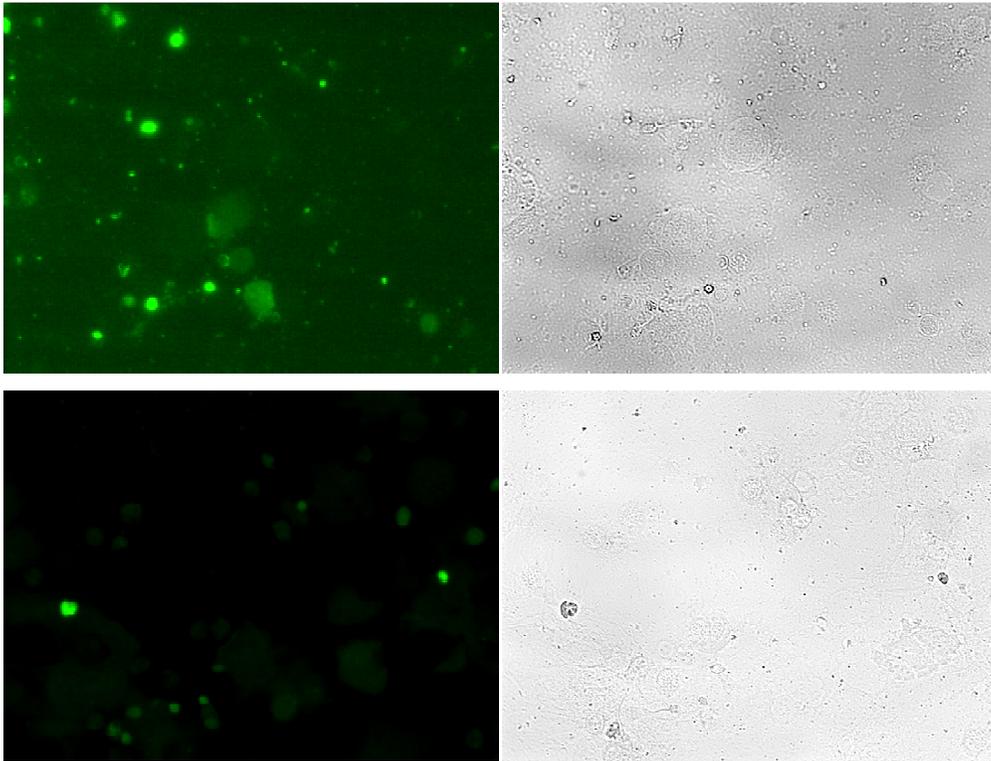


Abbildung 3.29: Ausgestrichene, PAF fixierte Hodenbiopsie. Links: Fluoreszenzmikroskop; rechts: lichtmikroskopische Aufnahme.

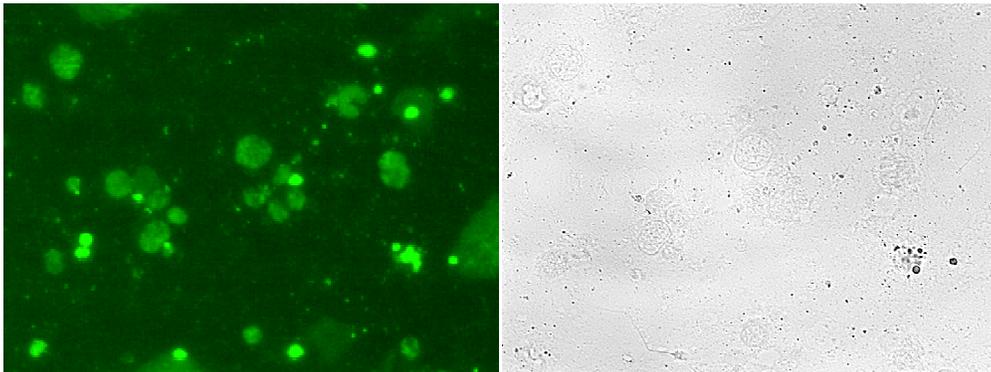


Abbildung 3.30: Ausgestrichene, PAF fixierte Hodenbiopsie (Positivkontrolle). Links: Fluoreszenzmikroskop; rechts: lichtmikroskopische Aufnahme.

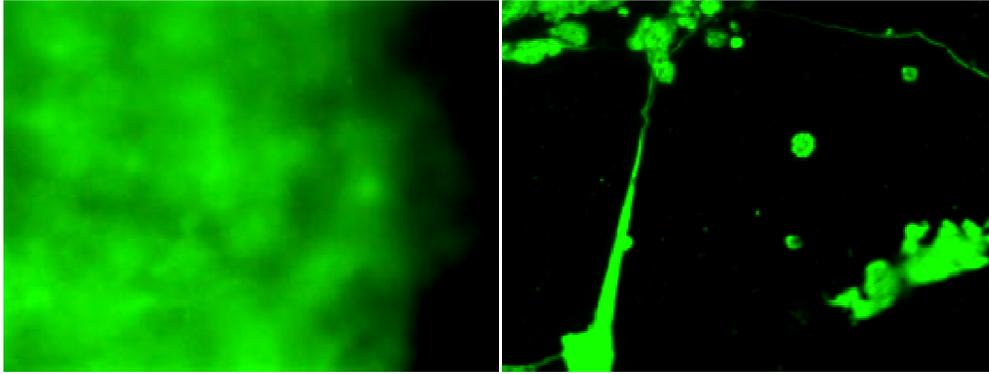


Abbildung 3.31: Fluoreszenzfarbstoff, welcher nicht aus Gewebe herauszuwaschen war.

3.6 Bioanalyzergestützte Bestimmung von DNA-Fragmentierung in ejakulierten Spermien

Eine statistische Auswertung der Messergebnisse des Bioanalyzers war aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit der Werte nicht möglich (Abbildung 3.33).

Da sich Spermien positiv rheotaktisch verhalten, sind oftmals die bereits ins Sammelgefäß gesaugten Zellen wieder durch die Kapillaren zurück in die Vertiefungen („Wells“) geschwommen, in die sie zu Beginn des Versuches hineinpipettiert worden waren (vgl. Abbildung 2.6). Somit erfolgten durch den Laser fehlerhafte Doppelmessungen und die Messungen waren nicht auswertbar.

Zudem verknoteten sich viele Zellen während des Wasch- und Färbevorgangs über ihre Flagellen, sodass regelmäßig größere Zellaggregate entstanden, die die Kapillare verstopften. Dieses Problem trat besonders bei Färbungen mit dem TUNEL-Farbstoff auf, da die Aufbereitung für diese Messung sehr viele Wasch- und Färbeschritte voraussetzt und dementsprechend mit sehr häufigem Zentrifugieren einhergeht. Die Zentrifugalkraft, welche sich schon in den Cytospin[®]-Versuchen (vgl. Abschnitt 3.2) als problematisch erwies, limitierte auch in dieser Versuchsreihe das Vorgehen.

3.6.1 Dot-Plot des Bioanalyzers

Es ergaben sich jedoch nicht nur Probleme aufgrund der Spermienmotilität und der Färbung. Auch der Dot-Plot, die zweidimensionale Darstellung von Ereignissen, war häufig nicht auswertbar.

Nachfolgend sind sieben Plots aus den Versuchsreihen dargestellt, um die Problematik näher zu illustrieren (Abbildungen 3.33 – 3.36).

Im Dot-Plot wird bei jedem Ereignis die Fluoreszenz dargestellt, welche als rot auf der Ordinate und als blau auf der Abszisse abzulesen ist (Abbildung 3.32). Ein Ereignis mit grüner Fluoreszenz kann laut Herstellerangaben durch den Laser erkannt und aus beiden Fluoreszenzen gemischt werden. Grüne Fluoreszenz würde folglich im oberen rechten Quadranten des Dot-Plots zu finden sein (Abbildung 3.32).

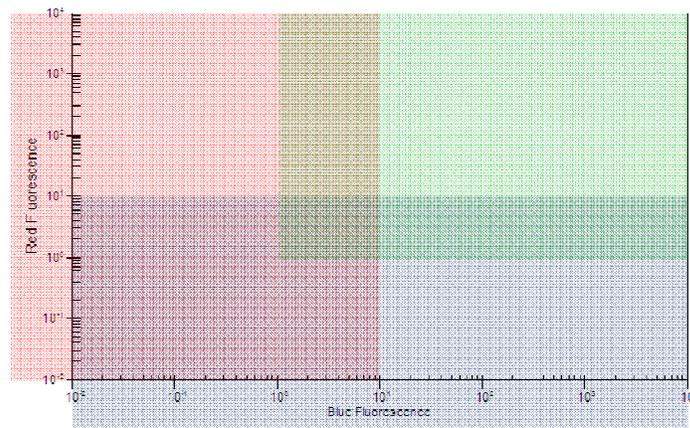


Abbildung 3.32: Beispiel eines Dot-Plots des Bioanalyzers mit Veranschaulichung der einzelnen Fluoreszenzbereiche.

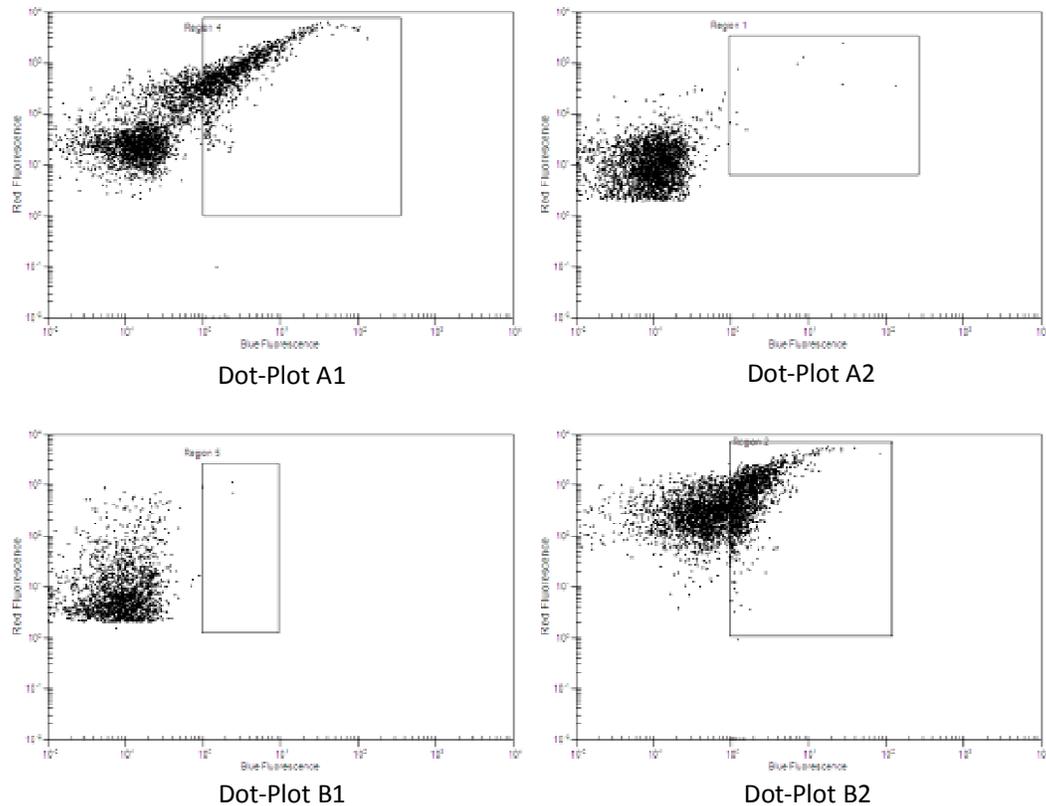


Abbildung 3.33: Fehlende Replizierbarkeit eines Dot-Plots.

Die fehlende Replizierbarkeit der Bioanalyzerverdaten wird in Abbildung 3.33 verdeutlicht. In dem Versuchsaufbau wurde dieselbe Probe, d. h. gewaschenes und gefärbtes Ejakulat aus demselben Reagenzglas, in mehrere Messvertiefungen („Wells“) des Zellchips pipettiert. In den Dot-Plots A1 und A2 wurde dasselbe Ejakulat in demselben Durchlauf nur in unterschiedlichen „Wells“ verwendet, sodass sich grafisch das gleiche Muster einstellen müsste. Wie in Abbildung 3.33 dargestellt, waren die Punktwolken jedoch grundverschieden. Das gilt genauso für die Dot-Plots B1 und B2.

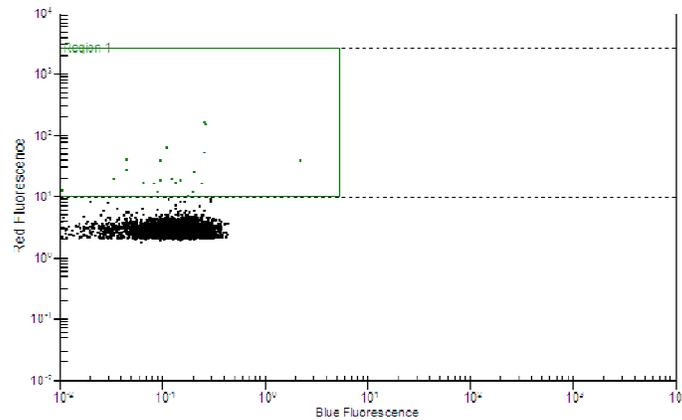


Abbildung 3.34: Dot-Plot des Farbstoffes Annexin V ohne Spermien in Cell Buffer gelöst.

Der Bioanalytiker ist so konzipiert, dass dessen Laser mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen zum Fluoreszieren anregt, damit diese Zellen gezählt und im Dot-Plot oder Histogramm dargestellt werden können. Der Detektor sollte allerdings nicht den reinen Farbstoff erkennen und darstellen, sondern diesen von fluoreszierenden Zellen sicher unterscheiden können. Als in einem Versuchsaufbau jedoch nur der Fluoreszenzfarbstoff Annexin V ohne ein Spermium in den Zellpuffer von Agilent gegeben worden war, ergab sich dennoch ein Muster im Dot-Plot (Abbildung 3.34) mit mehr als 2000 Ereignissen.

Um das Ergebnis aus Abbildung 3.34 näher zu untersuchen, wurde der Farbstoff Annexin V in PBS gelöst und ohne Zellen in die „Wells“ pipettiert. Doch auch trotz dieser Veränderung wurden mehrere tausend Ereignisse im Dot-Plot angezeigt (Abbildung 3.35).

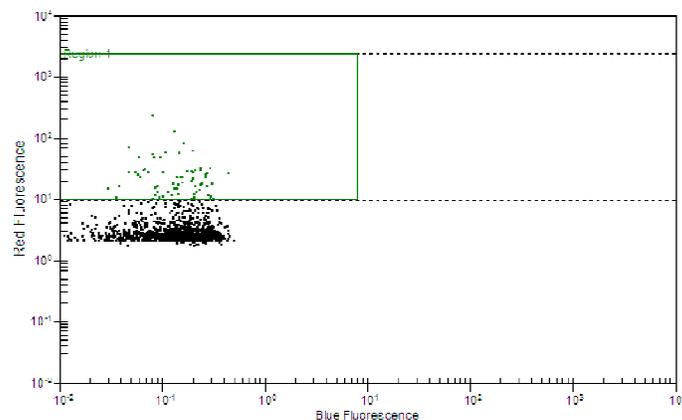


Abbildung 3.35: Dot-Plot des Farbstoffes Annexin V ohne Spermien in PBS gelöst.

Um auszuschließen, dass dieses Ergebnis nicht durch kleine, im Farbstoff enthaltene Partikel zu begründen war, wurde der Farbstoff zentrifugiert und anschließend wieder in Cell Buffer von Agilent aufgenommen. Während dieses Messvorgangs wurden jedoch sogar mehr Ereignisse gezählt als in den beiden vorangegangenen Untersuchungen (Abbildung 3.36).

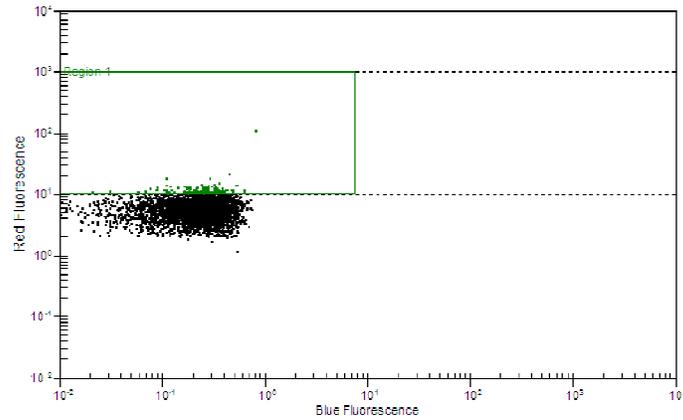


Abbildung 3.36: Dot-Plot des zentrifugierten Farbstoffes Annexin V ohne Spermien in Cell Buffer gelöst.

4 DISKUSSION

4.1 Der Bioanalyzer

Das Ziel beim Einsatz des Bioanalyzers war es, die Durchflusszytometrie bei der Messung der Spermien-DNA-Fragmentierung zu imitieren. Mit dem Bioanalyzer sind Fluoreszenzmessungen an einer sehr kleinen Anzahl von Zellen durchführbar. Da für Untersuchungen mittels FACS™ sehr große Zellkonzentrationen nötig sind, sollte so auch bei Patienten mit Oligozoospermie eine DNA-Analyse der Spermien möglich gemacht werden.

Laut Hersteller lässt sich neben roter und blauer Fluoreszenz, durch eine Mischung beider grüne Fluoreszenz detektieren. Dieses stellte sich jedoch als eine nicht eindeutige Messvariante heraus, da es sowohl im Histogramm als auch im Dot-Plot nur Achsen für rote und blaue Fluoreszenz gibt. So fiel die exakte Bestimmung grüner Fluoreszenz schwer. Die grüne Fluoreszenz wäre aber für die TUNEL-Färbung essentiell gewesen.

Dieser Versuch musste aber nicht nur wegen unpassender Fluoreszenz abgebrochen werden. Es waren zudem sehr viele Färbe- und Waschschriffe notwendig, bei denen die Proben jedes Mal zentrifugiert werden mussten. Dabei gingen mit dem Überstand bei jedem Zentrifugieren Zellen verloren. Außerdem verknoteten sich die Flagellen der Spermien miteinander, sodass sich große Konglomerate bildeten, die nicht mehr durch die Kapillaren gesaugt werden konnten und diese verstopften.

Die Probleme mit der TUNEL-Methode führten dazu, andere Färbungen vorzunehmen. Annexin V stellte aufgrund der Rotfluoreszenz des Farbstoffes eine Alternative dar. Annexin V eignet sich jedoch nicht zur Routinetestung von DNA-Fragmentierung, da es bei einer Akrosomreaktion an externalisiertes Phosphatidylserin, und bei durchlässiger Doppellipidschicht auf der Innenseite der Zellmembran binden kann (vgl. Kapitel 1.7). Zudem erwies sich die Konzeptionierung des Bioanalyzers als nicht geeignet für Messungen an motilen Zellen. Um die Membran nicht zu permeabilisieren, mussten diese Versuche an unfixierten Spermien durchgeführt werden. Diese bewegten sich jedoch gegen den Unterdruck des Geräts, welcher sie in ein Sammelgefäß saugte, zurück durch die Kapillaren zum Ausgangsort. So passierten sie den Laser und auch den Detektor mehrmals. Es waren keine quantitativ exakten Ergebnisse zu erzielen. Durch PAF immobilisiert, war die für die Annexin-V-Färbung nötige Undurchlässigkeit der Lipiddoppelschicht aber nicht mehr gewährleistet.

Desweiteren konnten die Versuche nicht reproduziert werden. Die Muster des Dot-Plots derselben Probe sahen in verschiedenen Durchläufen unterschiedlich aus.

Außerdem wurden Luftbläschen sowie Farbstoff in Abwesenheit von Zellen als fluoreszierende Zellen gezählt. Es war zudem nicht sicherzustellen, ob der Bioanalyzer fehlerlos quantifizierte, da keine Überprüfung des Messvorgangs möglich war.

Somit konnte festgestellt werden, dass der Bioanalyzer keinen geeigneten Ersatz für ein Flowcytometer darstellt.

4.2 Untersuchungen an Spermienausstrichen

Da sich der Bioanalyzer als Messinstrument für Spermien-DNA als ungeeignet erwies, wurde der Fokus auf die Analyse der DNA-Integrität von Spermienausstrichen gelegt. Bei der Ermittlung der DNA-Fragmentierung ergaben sich immer wieder methodische Schwierigkeiten. Häufig scheiterten schon die Vorversuche, oder es stellte sich heraus, dass die Versuchsdurchläufe nicht reproduzierbar waren. Selbst mit etablierten Untersuchungsprotokollen ließen sich keine validen Ergebnisse erzielen, da entweder Färbung oder Positivkontrolle nicht verwertbar waren.

Die Ausstriche der ejakulierten Spermien wurden mit 4%igem PAF fixiert, da dieses Fixativum für Untersuchungen der DNA-Integrität etabliert ist [Greco *et al.*, 2005].

Formaldehyd und somit auch Paraformaldehyd nehmen durch chemische Reaktionen in verschiedener Weise Einfluss auf die DNA fixierter Zellen [Srinivasan *et al.*, 2002]. Chohan *et al.* (2004) zeigten, dass 4%iges PAF in Versuchsreihen mit Acridine Orange signifikant weniger Fluoreszenz aufweist als drei andere Fixativa. Sogar im Vergleich zur Färbung ohne Fixativum war weniger Fluoreszenz nachweisbar. Da Formaldehyd zu Quervernetzungen von Proteinen führt [Chohan *et al.*, 2004], ist dieses Ergebnis besonders für die TUNEL-Färbung interessant. Durch die Quervernetzung besteht die Möglichkeit der geringeren Verfügbarkeit von freien Enden für den Fluoreszenzfarbstoff und somit der Bestimmung von falsch negativen Fluoreszenzwerten.

Da der Mittelwert der Fluoreszenz ejakulierter Spermien in der vorliegenden Arbeit $14,6\% \pm 38,2\%$ ergab, hätte dieses zu bedeuten, dass von einer deutlich höheren Fluoreszenz auszugehen ist. Ein höherer DFI wäre mit den Werten aus der Literatur vereinbar, bei denen eine Schwangerschaft auf natürlichem Wege unwahrscheinlich ist (DFI > 27-30%) [Paasch *et al.*, 2007].

Evenson & Wixon (2006) gaben zu bedenken, dass jedes Labor eigene Referenzwerte für die Methodik erstellen müsse. Sie halten die TUNEL-Methode prinzipiell für zukunftssträftig, jedoch für die andrologische Praxis derzeit noch nicht geeignet, da bislang noch keine einheitlichen Schwellenwerte herausgefunden wurden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Spermienausstriche aus Abbildung 3.1 auf Seite 27 fällt auf, dass der Prozentsatz fluoreszierender Zellen geringer ist, als aufgrund der Literaturwerte zu erwarten gewesen wäre [Paasch *et al.*, 2007]. Der Theorie folgend, dass Patienten einer andrologischen Praxis im Mittel einen höheren DFI aufweisen müssten als ein unselektiertes Kollektiv, erscheint der Mittelwert der Patienten A bis J mit $14,6\% \pm 38,2\%$ niedrig.

Paasch *et al.* (2007) behaupten, dass erst ab einem DFI von etwa 30% die Konzeption auf natürlichem Wege sehr unwahrscheinlich ist. Aber zusätzlich zu der Erkenntnis, dass eventuell aufgrund der PAF-Fixierung zu wenig Fluoreszenz gemessen wurde [Chohan *et al.*, 2004], haben Greco *et al.* (2005) herausgefunden, dass ab einem Wert von $>15\%$ TUNEL-positiven Spermatozoen bei ICSI-Paaren nur eine 5,6%ige Schwangerschaftsrate erreicht wurde, während bei denselben Paaren nachfolgender Behandlungsversuche, bei denen $<6\%$ der Spermatozoen TUNEL-positiv waren, die Schwangerschaftsrate auf 44,4% stieg.

Moskovstev *et al.* (2008) führten eine Studie unter ähnlichen Bedingungen wie Greco *et al.* (2005) durch, hatten aber ein deutlich größeres Patientenkollektiv. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass testikuläre Keimzellen mit durchschnittlich 13,3% deutlich weniger fragmentiert sind als ejakulatorisch gewonnene Zellen mit einer durchschnittlichen Fluoreszenz von 39,7%.

4.3 Untersuchungen an Hodenbiopsien

Im Zuge der vorliegenden Studie stellte sich die Frage, welches Fixativum optimal sei und welche Differenzen sich an derselben Probe durch verschiedene Fixierungen zeigen könnten. Für Hodenbiopsien halten die meisten Autoren mDF für das beste Medium, da die Tubuli artifiziell kaum schrumpfen und die zytomorphologischen Details am besten erhalten bleiben. Insbesondere die Färbung der zentral im Schnitt lokalisierten Tubuli ist sehr viel ausgeprägter als beispielweise nach Fixierung in Bouin'scher Lösung [Latendresse *et al.*, 2002; Bryant & Boekelheide, 2007].

Bryant & Boekelheide (2007) untersuchten Hodengewebe von Ratten und fixierten dieses genau wie Latendresse *et al.* (2002) für 24-48 Stunden, da sie der Meinung waren, dass geringere Zeiträume für eine komplette Fixierung des Gewebes nicht ausreichend sind.

Einige Arbeitsgruppen betonen, dass die Zeit zwischen Exzision und Fixierung der Probe möglichst gering sein sollte, damit Toxine dem Gewebe nicht schaden und durch *post mortem* induzierte DNA-Fragmentierung die Ergebnisse verfälscht werden [Srinivasan *et al.*, 2002; Bryant & Boekelheide, 2007].

Abgesehen davon, dass Bryant & Boekelheide (2007) *post mortem* fixierte Testes von Ratten untersuchten, kamen sie zu sehr ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Fluoreszenz wie in der vorliegenden Arbeit. Bei ihnen fluoreszierten im Mittel in 12% der Tubuli eine bis drei Spermatogonien oder Spermatozyten, während in der eigenen Untersuchung bei einem mJ-Score 10 in $14,4\% \pm 48,1\%$ der Tubuli eine Spermatozyte und in $2,2\% \pm 12,8\%$ der Tubuli eine Spermatogonie fluoreszierten.

Artefakte durch Toxine können in den hier verwendeten Biopsien vernachlässigt werden, da sich diese schon wenige Sekunden nach Entnahme im Fixativum befanden und so für mindestens 24 Stunden bei 4°C gelagert wurden.

Allerdings kann die Überfixierung der Hodenbiopsien nicht ausgeschlossen werden. Stadelmann & Lassmann (2000) fanden heraus, dass die Fixierdauer kurz gehalten werden sollte, da sonst die Sensitivität einer Fragmentierungsanalyse nachlässt. Srinivasan *et al.* (2002) meinen sogar, die Fixierung der Biopsie sollte nicht länger als 3-6 Stunden andauern.

Trotz dieser Einwände wurden die verwendeten Biopsien mindestens 24 Stunden fixiert, um sicherzustellen, dass das Fixativum bis zum Gewebezentrums vordringt. Es wurde Proteinase K zur Permeabilisierung der Proben verwendet, da Stadelmann & Lassmann (2000) dieses bei überfixiertem Gewebe empfehlen, um die Sensitivität der Untersuchung wieder zu steigern [Labat-Moleur *et al.*, 1998; Shamsi *et al.*, 2008].

In den Untersuchungen der Hodenbiopsien wurde deutlich, dass, verglichen mit den ejakulierten Spermien, kaum eine Zelle fluoreszierte. Aufgrund einer anderen Zählweise konnten die Spermienausstriche nicht direkt mit den Hodenbiopsien verglichen werden. Die Fluoreszenz aller Zellklassen war im Allgemeinen sehr gering, insbesondere in Spermatogonien und Spermatozyten ist praktisch keine Fluoreszenz nachweisbar gewesen. Die Spermatozyten des mJ-Score 10, welcher aufgrund intakter Spermatogenese idealerweise mit Ejakulat zu vergleichen ist, wiesen mit einer fluoreszierenden Zelle in $14,4\% \pm 48,1\%$ der Tubuli ebenfalls einen äußerst geringen DFI auf.

Entgegen aller Erwartungen fluoreszierten gelegentlich auch einzelne somatische, postmitotisch fixierte Sertolizellen. Die Fluoreszenz der Sertolizellen wird von Oldereid *et al.* (2001) auf die Phagozytose apoptotischer Keimzellen zurückgeführt.

Spermatozyten fluoreszierten deutlich häufiger als Spermatogonien. Bei den Spermatozyten lag ein noch geringerer Anteil fluoreszierender Zellen vor.

Marcon & Boissonneault (2004) postulieren, dass es während der Spermatogenese beim Ersetzen von Histonen durch Protamine zu transienten Strangbrüchen kommt, die zur Chromatinkondensierung notwendig sind.

Außerdem kommt es während der Meiose zur Rekombination der DNA, sodass besonders in Spermatozyten physiologische Strangbrüche nachweisbar sind [Marcon & Boissonneault, 2004]. Das würde bedeuten, dass die Fragmentierung, die fluoreszenzmikroskopisch in Spermatozyten nachgewiesen werden kann, nicht zwangsläufig auf einen Apoptosevorgang hindeutet, sondern eher einen physiologischen Umbauprozess der Keimzellen zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme bezeichnet.

In den postmeiotischen Zellen war keine Fragmentierung nachweisbar, sodass die Fragmentierung von ejakulierten Spermien als posttestikuläres Ereignis (*epididymal* oder *post ejaculationem*) anzunehmen ist [Greco *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2008; Sakkas & Alvarez, 2010].

Die Arbeitsgruppe Zee *et al.* (2009) hat dieses bekräftigt. Sie ermittelten, dass Einzelstrangbrüche während des Chromatinremodellings in der Spermatogenese physiologisch sind und, sofern sie nicht vom Spermium selbst repariert werden können, von der Oozyte ausgebessert werden. Doppelstrangbrüche können jedoch weder vom Spermatozoon noch von der Oozyte wieder verknüpft werden, sodass diese zur „echten“ Fragmentierung einer Zelle zählen, welche pathologisch und fertilitätssenkend ist [Paasch *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2008; Sakkas & Alvarez, 2010].

Die in den eigenen Untersuchungen gemessene Fluoreszenz von Spermatozyten „reiner“ mJ-Scores variierte jedoch stark von denen einer gemischten Atrophie. Die Fluoreszenz von Spermatozyten war bei einer „Mixed Atrophy“ deutlich geringer als bei dem entsprechenden reinen mJ-Score. Es wäre interessant herauszufinden, ob dieses Phänomen nur aufgrund der relativ geringen Probenzahl hervortrat oder aber – an einem größeren Kollektiv verifiziert – von genereller pathophysiologischer Relevanz ist.

Leider messen alle gängigen und miteinander vergleichbaren Methoden, wie die neutrale Comet-Analyse, die SCSA[®]- sowie die TUNEL-Methode, sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche [Makhlouf & Niederberger, 2006; Paasch *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2008].

Da das Chromatinremodelling ein intratestikulärer Prozess ist, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse abgeleitet werden, dass die Fragmentierung ejakulierter Spermien als pathologisches Kriterium anzusehen ist.

Es ist angekündigt worden, eine 2D-Comet-Analyse zu entwickeln, die zwischen Doppel- und Einzelstrangbrüchen unterscheiden kann [Sakkas & Alvarez, 2010]. Bis diese jedoch zuverlässige Resultate liefert, muss auf Methoden, wie z.B. TUNEL, zurückgegriffen werden.

Dessen ungeachtet ist zu erkennen, dass bei abnehmendem mJ-Score, d.h. bei zunehmender Spermatogenesestörung, die Fluoreszenz der Spermatozyten steigt. Bei einem mJ-Score 5 fluoreszierte im Durchschnitt in $58,5\% \pm 175,4\%$ der Tubuli eine Spermatozyte, während beim mJ-Score 10 nur in $14,4\% \pm 48,1\%$ der Tubuli eine Spermatozyte leuchtete.

Es wäre daher denkbar, dass bei meiotischem Arrest (mJ-Score 5) körpereigene Reparaturmechanismen nicht so effektiv arbeiten und entstehende DNA-Fragmentierung öfter zur Apoptose führt als bei Patienten mit vollständiger Spermatogenese (mJ-Score 10). Anhand der hier vorgestellten Versuche kann die Ursache bzw. Wirkung der DNA-Fragmentierung nicht bestimmt werden.

Die Fluoreszenz der ausgestrichenen Hodenbiopsien liegt weit über der der Spermienausstriche (Abbildung 3.26, Seite 47). Dieses Ergebnis könnte auf einen Artefakt zurückzuführen sein. In den Ausstrichen befinden sich auch zahlreiche Sertolizellen. Sollten Keim- und Sertolizellen durch die mechanische Belastung während des Ausstreichens beschädigt werden, könnten die freiwerdenden Lysosomen der Sertolizellen die DNA der Spermien fragmentieren oder zumindest die Qualität negativ beeinflussen.

Dieses Ergebnis ist mit keinem der vorherigen Ergebnisse zu vereinbaren und zeigt, wie empfindlich Hodengewebe auf exogene Reize reagiert.

4.4 Der DNase-Verdau

Die Erstellung von Positivkontrollen der einzelnen Versuche erwies sich als schwierig. Es sollten Doppelstrangbrüche in den fixierten und permeabilisierten Spermatozoen sowie in den Zellen der Biopsie durch die Zugabe von DNase induziert werden.

Bei der anschließenden TUNEL-Reaktion der Positivkontrolle gelang es aber nur selten, eine Fragmentierungsrate von mehr als 50% zu erlangen. Zudem fluoreszierten bei geglückter Positivkontrolle häufig auch auf den Objektträgern ohne DNase-Zugabe nahezu alle Zellen (vgl. Abbildung 3.4).

Bei Hodenbiopsien gelang es häufiger, eine gute Positivkontrolle zu erzielen als bei Spermienausstrichen. Es fluoreszierten in einer Biopsie in der Regel >85-90% der Zellen der Positivkontrolle. Die Schnitte ohne DNase wiesen kaum Fluoreszenz auf.

Da Reste des Citrats nach dem Permeabilisieren trotz ausreichender Spülung in den Zellen bleiben könnten, wurde ein Permeabilisierungspuffer ohne Citrat gewählt. So sollte verhindert werden, dass residuales Citrat im nächsten Schritt Magnesium aus dem DNase Puffer abfangen und den Verdau stoppen könnte.

Die Biopsien wurden zum direkten Vergleich für 8 Minuten in PBS mit 0,1% TritonX-100 permeabilisiert. In der Literatur wird zudem häufig ein Puffer mit Proteinase K zur Permeabilisierung genutzt [Labat-Moleur *et al.*, 1998; Stadelmann & Lassmann, 2000; Shamsi *et al.*, 2008]. Das Ergebnis war erstaunlicherweise bei allen drei Ansätzen nahezu gleich, sodass keine Methode einen wesentlichen Vorteil brachte. Um Interaktionen mit Magnesium sicher auszuschließen und im Falle einer Überfixierung realistischere Ergebnisse zu erzielen, wurde der Puffer mit Proteinase K verwandt.

Applied Biosystems™ (2010) erklären auf ihrer Homepage, dass schon 20 mM NaCl die DNase zu 30% inhibieren können. Da in dieser Arbeit PBS zum Waschen verwandt wurde, welches 138 mM NaCl beinhaltet, könnte das Waschen einen Grund für die heterogenen DNase-Ergebnisse sein.

Diese These erklärt aber nicht die Unterschiede zwischen den Positivkontrollen ejakulierter Spermien und Biopsien, da die Waschschritte bei beiden Versuchen äquivalent waren. Es bekräftigt eher die Annahme, dass es sich hierbei um ein Phänomen der erhöhten Verpackungsdichte durch Protamine handelt [U. Paasch, Universität Leipzig, persönliche Mitteilung].

Für diese Hypothese spricht zudem, dass die meisten Zellen einer Biopsie sich im Gegensatz zu ejakulierten Spermien noch im Umbauprozess befinden und somit weniger dicht verpackt sind. Der prozentuale Anteil der fluoreszierenden Zellen in Positivkontrollen könnte somit ein Index für den Verpackungszustand der DNA sein.

4.5 Färbungen

TUNEL steht für „TdT-mediated dUTP-biotin nick-end labeling“ und macht Einzel- und Doppelstrangbrüche durch grüne Fluoreszenz erkennbar [Nieschlag & Behre, 2009].

Labat-Moleur *et al.* (1998) kritisieren allerdings, dass die TUNEL-Methode zwar einfach in der Handhabung, dafür aber auch wenig sensitiv und spezifisch sei. Die Einschränkungen seien aber hauptsächlich durch die Bearbeitung zu erklären.

Einige Fixativa können Bestandteile der DNA vernetzen, sodass geringere DNA-Fragmentierung nachzuweisen wäre [Chohan *et al.*, 2004] (vgl. Abschnitt 4.2, Seite 56).

Acridine Orange (AO) ist ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert, um so Strangbrüche sichtbar zu machen. Bei intakter DNA fluoresziert das Spermium grün, während die Zellen rot fluoreszieren, sobald Einzel- oder Doppelstrangbrüche vorliegen [Nieschlag & Behre, 2009]. Evenson & Wixon (2006) haben intensiv mit dem Acridine Orange-Test (AOT) auf Objektträgern experimentiert und kamen zu dem Schluss, dass sich dieser Test nicht für den Klinikalltag eignet.

Durch ungleiche Verteilung des Farbstoffes bzw. eine erhöhte Konzentration an einigen Stellen des Objektträgers fluoreszieren Zellen entweder komplett rot oder komplett grün, sodass man nicht von einem natürlichen Fragmentierungsmuster ausgehen kann. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in den Vorversuchen der eigenen Untersuchung gemacht.

Shamsi *et al.* (2008) sahen die Grenzen des Tests vor allem in der undeutlichen Färbung und der schnell verblassenden Fluoreszenz. Sie bemerkten jedoch auch eine Heterogenität der Farbtintensität auf einem Objektträger [Paasch *et al.*, 2007, Shamsi *et al.*, 2008].

Die SCSA[®]-Methode (Sperm Chromatin Structure Assay) verwendet auch AO zur Färbung, misst die Zellen aber in einem Durchflusszytometer, welches den Kritikpunkt der unterschiedlichen Menge der Färbelösung pro Zelle aufhebt [Paasch *et al.*, 2007, Shamsi *et al.*, 2008]. Mit dieser Methode wird der DFI berechnet, welcher den Quotienten aus fragmentierten Zellen zur Gesamtzahl aller Zellen angibt. In der Literatur wird ein DFI von >27-30% [Evenson & Wixon, 2006; Bungum *et al.*, 2007; Paasch *et al.*, 2007] als Schwellenwert für eine natürliche Befruchtung angegeben.

Makhlouf & Niederberger (2006) kritisieren die SCSA[®]-Methode, da diese im sauren Milieu erfolgt. Es werde nur die Empfänglichkeit für DNA-Fragmentierung und nicht, wie bei der TUNEL-Methode oder der neutralen Comet-Analyse, die vorhandene Fragmentierung gemessen.

Da die gemessene Fragmentierung der TUNEL- und SCSA[®]-Methode miteinander korrelieren [Makhlouf & Niederberger, 2006; Nieschlag & Behre, 2009], ist die Studie von Domínguez-Fandos *et al.* (2007) sehr beachtenswert. Die Arbeitsgruppe verglich die nach TUNEL-Färbung messbare DNA-Fragmentierung per Durchflusszytometrie mit jener in der Fluoreszenzmikroskopie. Die Fluoreszenz beider Methoden stand zwar in positiver Korrelation, die einzelnen Ergebnisse wichen jedoch stark voneinander ab. So fluoreszierten im Ausstrich nur $15,8\% \pm 11,0\%$, während in der Durchflusszytometrie $39,7\% \pm 23,1\%$ der Zellen zum Leuchten angeregt wurden. Dieses Ergebnis entspricht dem dieser Arbeit. Es fluoreszierten im Mittel $14,6\% \pm 38,2\%$ der ausgestrichenen Spermien aus Ejakulaten.

Sakkas & Alvarez (2010) weisen in einer aktuellen Studie daraufhin, dass die mit der TUNEL-Methode gemessene Spermienfragmentierung signifikant mit den erzielten Schwangerschaften korrelierte, während mittels SCSA[®] keine Korrelation zwischen Fluoreszenz und IVF-Ergebnis abzuleiten war. Daher sei TUNEL die zu bevorzugende Färbemethode.

Mitchell *et al.* (2010) belegten wiederum, dass die normale TUNEL-Methode die DNA-Schädigung unterschätzt. Sie entwickelten eine modifizierte TUNEL-Methode, bei der das Gewebe mit Dithiothreitol (DTT) vor der Fixierung 45 Minuten inkubiert wird. In ihren Ergebnissen korreliert die daraufhin gemessene Fragmentierung deutlich besser mit der durch Fentons Reagenz, ein Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Eisen(II)-Salzen, induzierten oxidativen DNA-Schädigung.

4.6 Resümee

Die derzeit empfohlenen WHO-Parameter zur Untersuchung des Ejakulats, sowie standardisierte Untersuchungen, wie skrotale Sonographie und Hormonanalyse, sind bei einer Fertilitätsdiagnostik nicht ausreichend [Smit *et al.*, 2009]. Aufgrund dessen sollte das Untersuchungsspektrum bei bestimmten Patientengruppen um Fragmentierungsanalysen der Spermien-DNA erweitert werden [Nieschlag & Behre, 2009].

Auch wenn viele Arbeitsgruppen der TUNEL-Methode zwar eine klinisch relevante Perspektive einräumen, sie jedoch derzeit für noch nicht alltagstauglich halten [Smit *et al.*, 2009; Nieschlag & Behre, 2009], kann anhand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit festgelegt werden, dass ejakulierte Spermien deutlich mehr Fluoreszenz aufwiesen als Keimzellen in Hodenbiopsien.

Desweiteren empfiehlt sich die Validierung der modifizierten TUNEL-Methode, bei der die Proben vor Fixierung mit DTT für 45 Minuten inkubiert werden, um eine bessere Korrelation mit induzierter Fragmentierung zu erhalten [Mitchell *et al.*, 2010].

Aufgrund der eigenen Untersuchungsergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die DNA-Fragmentierung von Spermien ein vorwiegend posttestikuläres, also epididymales oder ejakulatorisches, Ereignis ist. Doch auch eine iatrogene Induktion von DNA-Fragmentierung unterschiedlichen Ausmaßes ist nicht vollständig auszuschließen. So kann einer Biopsie durch die Paraffineinbettung, das Schneiden sowie vor allem auch durch die Permeabilisierung weiterer Schaden zugefügt werden [Stadelmann & Lassmann, 2000]. Insbesondere bei Spermienausstrichen ist nach dem Zentrifugieren durch die Entfernung des schützenden Seminalplasmas mit seinen Antioxidantien die Fragmentierungsgefahr der Spermatozoen durch die ROS deutlich erhöht [Paasch *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2008].

Sofern die DNA-Fragmentierung in Spermien als posttestikuläres Ereignis anzusehen ist, würde sich auch bei Männern mit Oligozoospermie und unerfülltem Kinderwunsch die Entnahme einer Hodenbiopsie zur Gewinnung von testikulären Spermatozoen für ICSI anbieten. So könnte eine bessere DNA-Integrität der Gameten gewährleistet werden [Greco *et al.*, 2005; Moskovstev *et al.*, 2008].

Doch zuvor muss untersucht werden, ob mit testikulären Spermien, die weniger Fluoreszenz aufwiesen, auch bessere Fertilisierungsraten zu erzielen sind als mit ejakulatorisch gewonnenen Spermien [Moskovstev *et al.*, 2008].

Vorrangig ist zunächst erforderlich, zuverlässigere Methoden für Positivkontrollen zu entwickeln. Außerdem sollte untersucht werden, ob die mittels der TUNEL-Methode gemessene Fluoreszenz tatsächlich auf pathologisch relevanter DNA-Fragmentierung beruht und keine transienten Einzelstrangbrüche darstellt.

Die American Society for Reproductive Medicine (2008) ist bisher der Ansicht, dass es zur Zeit keine überzeugenden Gründe gibt, die DNA-Testung zur Evaluation von Infertilität routinemäßig durchzuführen. Da die meisten Arbeitsgruppen zu uneinheitlichen Ergebnissen kommen und kein Konsens über die einzelnen Messvarianten besteht, muss das Fazit der American Society for Reproductive Medicine bestätigt werden. Danach liegt derzeit noch keine klinische Relevanz für DNA-Integritätsanalysen zur Bestimmung der Spermienqualität in Ejakulaten vor.

Allerdings zeichnet sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine innovative reproduktionsmechanische Behandlungsperspektive ab: Sollten ejakulierte Spermatozoen zu unbefriedigenden Fertilisierungs- bzw. Schwangerschaftsraten führen, könnte der Einsatz bioptisch gewonnener, testikulärer Gameten für die intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion erwogen werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Infertilität betrifft mit einer Prävalenz von 15% viele Paare in Deutschland. Zur Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten eines unerfüllten Kinderwunsches ist eine effiziente Kausalitätsforschung wichtig. Die nach WHO-Kriterien durchgeführten Ejakulatuntersuchungen korrelieren nach aktueller Studienlage nicht ausreichend mit Fertilisierungsfähigkeit, Implantations- und Geburtenrate.

In vielen Studien wurde bereits ermittelt, dass ein hoher DFI in Spermien mit männlicher Infertilität korreliert. Es haben sich bisher drei Methoden zur Untersuchung der DNA in Spermienausstrichen als perspektivisch klinisch relevant erwiesen: Die neutrale Comet-Analyse, die SCSA[®]- und die TUNEL-Methode.

In dieser Arbeit wurde die TUNEL-Methode angewendet, da diese aufgrund der direkten Fragmentierungsmessung als besonders aussagekräftig anzusehen ist.

Es war nicht möglich, die DNA-Integritätsanalyse des FACS[™] mit Hilfe des Bioanalyzer, einem Gerät zur Detektion und Quantifizierung von DNA, RNA, Proteinen und Zellen mittels Fluoreszenz, zu etablieren.

Zurzeit wird noch kontrovers diskutiert, ob es sich bei DNA-Fragmentierung um ein intra- oder posttestikuläres Phänomen handelt. Der Vergleich der DNA-Integrität von ejakulierten Spermien und Spermien in Hodenbiopsien lässt vermuten, dass die DNA-Strangbrüche posttestikulär entstehen. Die Fragmentierung ereignet sich entweder während der Passage durch den Nebenhoden oder *post ejaculationem*. In den Hodenbiopsien, welche mittels mDF fixiert worden waren, erschien die DNA nahezu intakt. Im Gegensatz zum Ejakulat war kaum DNA-Fragmentierung nachweisbar. Die nachgewiesene Fluoreszenz konzentrierte sich in den Biopsien vor allem auf Spermatozyten, sodass von transienten Einzelstrangbrüchen während der Meiose ausgegangen werden kann.

Aufgrund der Tatsache, dass intratestikulär keine nennenswerte Fragmentierung nachweisbar ist, wäre es denkbar, bei hohen ejakulatorischen Fragmentierungsraten testikuläre Spermien für ICSI zu verwenden, um so höhere Schwangerschaftsraten zu erzielen. Derzeit bietet das Methodenspektrum der DNA-Integritätsanalyse noch keine gesicherte Grundlage für Routinetestungen. Insgesamt eröffnet die Methodik aber eine Perspektive für eine verbesserte reproduktionsmedizinische Diagnostik und Behandlung ungewollt kinderloser Paare.

6 SUMMARY

With a prevalence of 15%, infertility is a major burden for many couples in Germany. To improve the treatment of infertility research into its cause is important. A review of current clinical trials indicates that fertility tests according to WHO criteria are not sufficiently correlating to fertility rate, implantation rate and birth rate.

Based on many studies it has been found, that a high DNA fragmentation index (DFI) in sperm correlates with male infertility. Three methods of DNA integrity testing were found to be promising: The neutral comet analysis, SCSA[®] and TUNEL.

In this study TUNEL was applied, because it was found to be particularly significant due to the direct measurement of DNA fragmentation.

It was not possible to establish the DNA integrity analysis of FACST[™] in an inexpensive and timesaving way by using the Bioanalyzer, which is an instrument to detect and quantify DNA, RNA, proteins and cells via fluorescence.

At present there is still a controversial discussion whether DNA fragmentation is an intra- or post-testicular event. Based on this study's results of fluorescence microscopic analysis on sperm smears and testicular biopsies it is assumed, that DNA strand breaks arise post-testicularly. The DNA fragmentation occurred either during the passage through the epididymis or post ejaculation. The DNA in these testicular biopsies, which were fixed with mDF maintaining an excellent morphology, appeared almost intact. In contrast to ejaculated sperm, virtually no DNA fragmentation was detectable. The fluorescence detected in testicular biopsies was encountered mainly in spermatocytes, possibly induced by transient single-strand breaks during meiosis.

Due to the fact that no significant fragmentation is detectable intratesticularly, it might be feasible for men with a high DFI in ejaculated sperm to use testicular sperm for ICSI in order to achieve a higher birth rate.

Currently, DNA integrity analysis offers no indication for routine testing of sperm, but may have substantial merit for medical diagnosis and treatment of unintentionally childless couples.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AO	Acridine Orange
AOT	Acridine Orange-Test
AZF	Azoospermia Factor
BMI	Body-Mass-Index
Bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
Comet-Assay	Einzelzellgelelektrophorese
DFI	DNA-Fragmentierungsindex
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Deoxyuridine Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS™	Fluorescence Activated Cell Sorting
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Salzsäure
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion
IL	Interleukin
iOAT	idiopathische Oligoasthenoteratozoospermie
IVF	„In-vitro-Fertilisierung“
IUI	Intrauterine Insemination
LDL	Low Density Lipoprotein
mDF	modified Davidson's Fluid
mJ-Score	modifizierter Johnsen Score
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NOA	nicht obstruktive Azoospermie
OA	obstruktive Azoospermie
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
O ₂	Sauerstoff
PAF	Paraformaldehyd
Pat.	Patient(en)

PBS	Phosphate Buffered Saline
PJ	Praktisches Jahr
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
SCO	Sertoli-cell-only-Symptomatik
SCSA [®]	Sperm-Chromatin-Structure-Assay
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
TdT	Terminal Deoxynukleotidyl-Transferase
TESE	Testikuläre Spermatozoenextraktion
TUNEL	Terminal deoxynukleotidyl-Transferase mediated dUTP nick-end labeling
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

8 LITERATURVERZEICHNIS

Agilent Technologies. (Januar 2006). Agilent Cell Assay Protocol. Waldbronn, Germany.

Agilent: Life Sciences Newsroom. (1. 10 2001). Abgerufen am 11. 07 2009 von http://www.agilent.es/about/newsroom/lasca/imagelibrary/images/cag_PRCA2300158_cellassay.jpg

Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology* (250), S. 66-69.

Aitken, R. J., & De Iliis, G. N. (2009). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod*.

Aitken, R. J., De Iliis, G. N., & McLachlan, R. I. (2008). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology* (32), S. 46-56.

American Society for Reproductive Medicine. (November 2008). The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertility and Sterility* (Vol. 90, Suppl 3), S. 178-180.

Applied Biosystems. (2010). *Ambion, Inc - Products*. (Applied Biosystems) Abgerufen am 24. 04 2010 von <http://www.ambion.com/catalog/CatNum.php?2238>

Becher, F. (1996). Flowzytometrie: Ein modernes Verfahren zur Zellanalyse. *Deutsches Ärzteblatt* (93), 12.

Becker, M., Börgermann, C., Sperling, H., & Rübber, H. (2006). Varikozele und männliche Infertilität. *Blickpunkt der Mann* (4 (2)), S. 26-29.

Bryant, B. H., & Boekelheide, K. (2007). Time-Dependent Changes in Post-Mortem Testis Histopathology in the Rat. *Toxicologic Pathology* (35), S. 665-671.

Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., et al. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction* (Vol. 22, No. 1), S. 174-179.

Cavallini, G. (2006). Review: Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl* (8 (2)), S. 143-157.

Chohan, K. R., Griffin, J. T., & Carrell, D. T. (2004). Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia* (36), S. 321-326.

Cocuzza, M., Sikka, S. C., Athayde, K. S., & Agarwal, A. (September - October 2007). Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility: An Evidence Based Analysis. *International Braz J Urol* (Vol. 33 (5)), S. 603-621.

- Collins, J. A., Barnhart, K. T., & Schlegel, P. N. (Apr 2008). Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* (89 (4)), S. 823-831.
- De Iuliis, G. N., Thomson, L. K., Mitchell, L. A., Finnie, J. M., Koppers, A. J., Hedges, A., et al. (2009). DNA Damage in Human Spermatozoa Is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress. *Biology of Reproduction* (81), S. 517-524.
- De Kretser, D. M., & Holstein, A. F. (1976). Testicular biopsy and abnormal germ cell. In E. Hafez (Hrsg.), *Human Semen and Fertility Regulation in Men* (S. 332-343). Mosby, St. Louis.
- Domínquez-Fandos, D., Camejo, M. I., Ballescà, J. L., & Oliva, R. (2007). Human Sperm DNA Fragmentation: Correlation of TUNEL Results As Assessed by Flow Cytometry and Optical Microscopy. *Cytometrie Part A* (71A), S. 1011-1018.
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* (65), S. 979-991.
- Ezeh, U. I., Moore, H. D., & Cooke, I. D. (1998). Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Human Reproduction* (Vol. 13, No. 11), S. 3066-3074.
- Feig, C., Kirchhoff, C., Ivell, R., Naether, O., Schulze, W., & Spiess, A.-N. (2007). A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction* (Vol. 13, No. 1), S. 33-43.
- Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., et al. (2005). Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction* (Vol.20, No.1), S. 226–230.
- Henkel, R., Bastiaan, H. S., Schüller, S., Hoppe, I., Starker, W., & Menkveld, R. (2010). Leucocytes and intrinsic ROS production may be factors compromising sperm chromatin condensation status. *andrologia* (Volume 42, Issue 2), S. 69-75.
- Herold, G. (2008). *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold.
- Holstein, A. F., Schulze, W., & Davidoff, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1, S. 107-123.
- Jezek, D., Knuth, U. A., & Schulze, W. (1998). Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Human Reproduction* (Vol. 13, No.5), S. 1230-1234.

- Johnsen, S. G. (1970). Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1, S. 2-25.
- Kiermer, V. (February 2005). FACS-on-a-chip. *Nature Methods* (Vol. 2, No.2), S. 91.
- Labat-Moleur, F., Guillermet, C., Lorimier, P., Robert, C., Lantuejoul, S., Brambilla, E., et al. (1998). TUNEL Apoptotic Cell Detection in Tissue Sections: Critical Evaluation and Improvement. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (46 (3)), S. 327-334.
- Latendresse, J. R., Warbritton, A. R., Jonassen, H., & Creasy, D. M. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. *Toxicologic Pathology* (Vol. 30, No.4), S. 524–533.
- Leschner, A. (2006). *Flowzytometrische Untersuchung der Apoptose humaner Spermatozoen mit Hilfe des Annexin V-Tests*. Dissertation, Medizin, Marburg.
- Lewis, S. E., Agbaje, I., & Alvarez, J. (2008). Review: Sperm DNA Tests as Useful Adjuncts to Semen Analysis. *Systems Biology in Reproductive Medicine* (54), S. 111-125.
- Lin, M. H., Kuo-Kuang Lee, R., Li, S. H., Lu, C. H., Sun, F. J., & Hwu, Y. M. (Aug. 2008). Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* (90 (2)), S. 352-359.
- Makhlouf, A. A., & Niederberger, C. (May/June 2006). DNA Integrity Test in Clinical Practice: It Is Not a Simple Matter of Black and White (or Red and Green). *Journal of Andrology* (Vol. 27, No. 3), S. 316-323.
- Marcon, L., & Boissonneault, G. (2004). Transient DNA Strand Breaks During Mouse and Human Spermiogenesis: New Insights in Stage Specificity and Link to Chromatin Remodeling. *Biology of Reproduction* (70), S. 910-918.
- Mitchell, L. A., De Iuliis, G. N., & Aitken, R. J. (2010). The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *International Journal of Andrology* (33), S. 1-12.
- Molecular Probes. (Dezember 2005). LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit. Molecular Probes/Invitrogen.
- Moskovstev, S. I., Jarvi, K., Mullen, J. B., Cadesky, K. I., Hannam, T., & Lo, K. C. (November 2008). Article in press: Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. *Fertility and Sterility*, S. 1-5.

- Nidacon. (2009). *Nidacon International AB / Embracing Life*. Abgerufen am 15. Mai 2009 von www.nidacon.com/IFU/images/PS-40-80Procedure.jpg
- Nieschlag, E., & Behre, H. M. (Hrsg.). (2002). *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Münster: Springer.
- Nieschlag, E., Behre, H. M., & Nieschlag, S. (2009). *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (3. Auflage Ausg.). Berlin: Springer.
- Oldereid, N. B., de Angelis, P., Wiger, R., & Clausen, O. P. (2001). Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Molecular Human Reproduction* (Vol. 7, No. 5), S. 403-408.
- Oosterhuis, G. J., & Vermes, I. (2004). Apoptosis in human ejaculated spermatozoa. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, S. 115-119.
- Paasch, U., Grunewald, S., & Glander, H.-J. (3 2007). DNA-Schäden ejakulierter Spermatozoen: ein prädiktiver Faktor für männliche Infertilität. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.* (4), S. 124-139.
- Paul, C., Melton, D. W., & Saunders, P. T. (2008). Mini Review: Do heat stress and deficits in DNA repair pathways have a negative impact on male fertility? *MHR-Basic Science of Reproductive Medicine* (Vol. 14, No. 1), S. 1-8.
- Preckel, T., & Luedke, G. (Oktober 2001). Apoptosis detection by annexin V and active caspase-3 with Agilent 2100 bioanalyzer. (A. Technologies, Hrsg.) Waldbronn, Germany.
- Roche. (July 2006). In Situ Cell Death Detection Kit, AP. Mannheim, Germany.
- Said, T., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Baumann, T., Kriegel, C., et al. (2006). Selection of Nonapoptotic Spermatozoa As a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An In Vitro Model. *Biology of Reproduction* (74), S. 530-537.
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (March 2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility & Sterility* (Vol. 93, No. 4), S. 1027-1036.
- Schulze, W. (1996). *Kryo-TESE-Konzept*. Abt. f. Andrologie, UKE, Hamburg, Germany.
- Schulze, W., Thoms, F., & Knuth, U. A. (1999). Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Human Reprod* 14, S. 82-96.
- Shamsi, M. B., Kumar, R., & Dada, R. (February 2008). Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* (127), S. 115-123.

- Sigg, C., & Hedinger, C. (1981). Quantitative and ultrastructural study of germinal epithelium in testicular biopsies with "mixed atrophy". *Andrologia* (13), S. 412-424.
- Skrzypek, J. (1999). *Flowcytometrische Untersuchung der akrosomalen Reaktion humaner Spermatozoen*. Dissertation, Humanmedizin, Marburg.
- Smit, M., Romijn, J. C., Wildhagen, M. F., Weber, R. F., & Dohle, G. R. (2009). Sperm chromatin structure is associated with the quality of spermatogenesis in infertile patients. *Fertility and Sterility*, S. 1-5.
- Srinivasan, M., Sedmak, D., & Jewell, S. (2002). Review: Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *American Journal of Pathology* (Vol. 161, No. 6), S. 1961-1971.
- Stadelmann, C., & Lassmann, H. (2000). Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* (301), S. 19-31.
- Varghese, A. C., Bragais, F. M., Mukhopadhyay, D., Kundu, S., Pal, M., Bhattacharyya, A. K., et al. (2009). Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia* (41), S. 207-215.
- Winkle, T., Gagsteiger, F., & Ditzel, N. (2007). Reduktion von apoptotischen Spermien im Ejakulat mittels MACS-System. *J. Fertil. Reprod.*, S. 19-21.
- World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5th Edition Ausg.). (WHO, Hrsg.) Geneva, Switzerland.
- Zee, Y. P., López-Fernández, C., Arroyo, F., Johnston, S. D., Holt, W. V., & Gosalvez, J. (2009). Evidence that single-stranded DNA breaks are a normal feature of koala sperm chromatin, while double-stranded DNA breaks are indicative of DNA damage. *Reproduction* (138), S. 267-278.
- Zini, A., & Libman, J. (2006). Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*, S. 495-500.

9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Zwei-Schritt-Hypothese zur Entstehung von DNA-Fragmentierung in Spermien durch reaktive Sauerstoffradikale nach vorausgegangenem Spermatogenesedefekt [modifiziert nach Aitken *et al.*, 2008; De Iuliis *et al.*, 2009; Aitken & De Iuliis, 2009].

Abbildung 2.1: Selektion von Spermien [Nidacon, 2009].

Abbildung 2.2: Zusammensetzung aller Teile für die Verwendung des Cytospin® (Thermo).

Abbildung 2.3: Bioptische Entnahme von Hodengewebe zur testikulären Spermatozoenextraktion (TESE) [Schulze, 1996].

Abbildung 2.4: Darstellung von sechs der sieben klinisch relevanten Hauptscores zur Erfassung des spermatogenetischen Status in Hodenbiopsien [Nieschlag & Behre, 2002].

Abbildung 2.5: Funktionsweise des Annexin-V-Tests zur Darstellung von Apoptose [Leschner, 2006].

Abbildung 2.6: Agilent 2100 Bioanalyzer [Agilent: Life Sciences Newsroom, 2001].

Abbildung 3.1: Fluoreszenz verschiedener PAF-fixierter und TUNEL-gefärbter Spermienausstriche einzelner Patientenproben im Vergleich zum Mittelwert (Standardabweichung = 38,2%).

Abbildung 3.2: Exemplarische Spermienausstriche von vier Patienten aus Abbildung 3.1 jeweils mit deren Positivkontrolle.

Abbildung 3.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Positivkontrolle, bei der keine Zelle deutlich fluoreszierte.

Abbildung 3.4: Vergleich zweier Spermienausstriche desselben Patienten ohne vorangegangenen DNase-Verdau (links) und mit vorangegangenem DNase-Verdau, Positivkontrolle (rechts).

Abbildung 3.5: Vergleich zweier Spermienausstriche desselben Patienten ohne vorangegangenen DNase-Verdau (links) und mit vorangegangenem DNase-Verdau, Positivkontrolle (rechts).

Abbildung 3.6: Vergleich der Spermienfluoreszenz auf luftgetrockneten Spermienausstrichen im Gegensatz zu durch Cytospin® fixierten Zellen jeweils mit zwei unterschiedlichen Fixativa.

Abbildung 3.7: Auflicht- und Fluoreszenzmikroskopie von unterschiedlich fixierten Ausstrichpräparaten sowie einer Positivkontrolle (PAF).

Abbildung 3.8: Auflicht- und Fluoreszenzmikroskopie von unterschiedlich fixierten Präparaten, welche mittels Cytospin[®] erzeugt wurden.

Abbildung 3.9: Exemplarische Darstellung einer Negativkontrolle aus den Versuchen mittels Cytospin[®].

Abbildung 3.10: Vergleich der Spermienfluoreszenz in Ausstrichen bei unterschiedlichen Fixierungen.

Abbildung 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer TUNEL-gefärbten Hodenbiopsie mit fluoreszierender Keimzelle im Tubuluslumen (links), Positivkontrolle (rechts).

Abbildung 3.12: Lichtmikroskopische Aufnahme H.E.-gefärbter Tubuli seminiferi eines Patienten mit einem mJ-Score 10 (links), Vergrößerung eines Tubulus (rechts).

Abbildung 3.13: Fluoreszenzmikroskopie von Präparaten aus Biopsien dreier mJ-Score-10-Patienten (links ohne DNase) mit jeweiliger Positivkontrollen (rechts mit DNase).

Abbildung 3.14: Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenz einzelner Zellklassen (eine fluoreszierende Zelle/angeschnittenen Tubulus) bei Patienten mit einem mJ-Score 10 (n=6).

Abbildung 3.15: Fluoreszenz der Sertolizellen bei verschiedenen Patienten mit einem mJ-Score 10.

Abbildung 3.16: Fluoreszenz der Spermatogonien bei verschiedenen Patienten mit einem mJ-Score 10.

Abbildung 3.17: Fluoreszenz der Spermatozyten bei verschiedenen Patienten mit einem mJ-Score 10.

Abbildung 3.18: Fluoreszenz der Spermatiden bei verschiedenen Patienten mit einem mJ-Score 10.

Abbildung 3.19: Veranschaulichung der Fluoreszenz der unterschiedlichen Zellen des Keimepithels im Vergleich einzelner mJ-Scores mit Standardabweichung.

Abbildung 3.20: mJ-Score 2 (links: H.E.-Kontrollschnitt; rechts: Fluoreszenzmikroskopie).

Abbildung 3.21: mJ-Score 5 (links: H.E.-Kontrollschnitt; rechts: Fluoreszenzmikroskopie).

Abbildung 3.22: mJ-Score 8 (links: H.E.-Kontrollschnitt; rechts: Fluoreszenzmikroskopie).

Abbildung 3.23: mJ-Score 10 (links: H.E.-Kontrollschnitt; rechts: Fluoreszenzmikroskopie).

Abbildung 3.24: „Mixed Atrophy“ (mJ-Score 8, 4, 2). Illustrierung der Fluoreszenz der einzelnen Zellen des Keimzellepithels in den mit unterschiedlichem mJ-Score-benoteten Tubuli und der Streuung zwischen einzelnen Patientenproben.

Abbildung 3.25: Mittelwerte der Patientendaten aus Abbildung 3.24 mit jeweiliger Standardabweichung (n=3).

Abbildung 3.26: Fluoreszenz (mit TUNEL-Färbung) bei einem Spermienausstrich aus einem Patientenejakulat im Vergleich zur Fluoreszenz bei einer ausgestrichenen Hodenbiopsie direkt nach Entnahme (n=1).

Abbildung 3.27: Ausgestrichene, mDF fixierte Hodenbiopsie. Links: Fluoreszenzbild; rechts: lichtmikroskopische Aufnahme zur Kontrolle.

Abbildung 3.28: Ausgestrichene, mDF fixierte Hodenbiopsie (Positivkontrolle). Links: Fluoreszenzbild; rechts: lichtmikroskopische Aufnahme zur Kontrolle.

Abbildung 3.29: Ausgestrichene, PAF fixierte Hodenbiopsie. Links: Fluoreszenzmikroskop; rechts: lichtmikroskopische Aufnahme.

Abbildung 3.30: Ausgestrichene, PAF fixierte Hodenbiopsie (Positivkontrolle). Links: Fluoreszenzmikroskop; rechts: lichtmikroskopische Aufnahme.

Abbildung 3.31: Fluoreszenzfarbstoff, welcher nicht aus Gewebe herauszuwaschen war.

Abbildung 3.32: Beispiel eines Dot-Plots des Bioanalyzers mit Veranschaulichung der einzelnen Fluoreszenzbereiche.

Abbildung 3.33: Fehlende Replizierbarkeit eines Dot-Plots.

Abbildung 3.34: Dot-Plot des Farbstoffes Annexin V ohne Spermien in Cell Buffer gelöst.

Abbildung 3.35: Dot-Plot des Farbstoffes Annexin V ohne Spermien in PBS gelöst.

Abbildung 3.36: Dot-Plot des zentrifugierten Farbstoffes Annexin V ohne Spermien in Cell Buffer gelöst.

Tabelle 2.1: Bewertung des spermatogenetischen Status mittels des modifizierten mJ-Scores [Johnsen, 1970; De Kretser & Holstein *et al.*, 1976; Schulze *et al.*, 1999; Nieschlag & Behre, 2002; Holstein *et al.*, 2003].

DANKSAGUNG

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. W. Schulze, aussprechen, der mir das interessante Thema bereitstellte. Er schuf die guten Rahmenbedingungen für die Arbeit und war mir jederzeit mit wichtigen Ratschlägen und sachlicher Kritik behilflich. Außerdem ließ er mich von seinem großen Wissen in der Andrologie profitieren.

Des Weiteren gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Dr. rer. nat. A.-N. Spiess, der mich bei der Durchführung der Experimente mit weiterführenden Ideen und bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Arbeit von Anfang an mit sehr viel Engagement betreut hat, und ohne dessen persönlichen Einsatz ich diese Arbeit nicht hätte beenden können.

Die gesamte Abteilung der Andrologie unterstützte mich ununterbrochen. Deshalb möchte ich meinen herzlichen Dank auch an Prof. Dr. rer. nat. C. Kirchhoff, Dr. rer. nat. H. Capallo-Obermann, sowie an die Dipl. biol. K. von Kopylow richten, die für Fragen stets offen waren, ihr Wissen an mich weitergaben und auch in schwierigen Phasen immer ein aufmunterndes Wort für mich übrig hatten.

Vielen Dank auch an Frau C. Völtzer und Frau G. Hahn für die Untersuchung, Aufbereitung und Bereitstellung der Samenproben und Hodenbiopsien.

Bei der Durchführung der Arbeit wurde ich freundlicherweise durch Herrn PD Dr. med. J. Köllermann, Institut für Pathologie am UKE (Anfertigung von Paraffinschnitten), sowie durch Dr. rer. nat. C. Lange, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation am UKE (Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops), unterstützt.

Ich möchte auch meinen Mädels für die langen Gespräche, das Korrekturlesen und vor allem die tolle Freundschaft danken. Ohne euch stünde ich jetzt nicht hier.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mich ununterbrochen liebevoll und insbesondere während meines Studiums auch finanziell unterstützt haben.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 30. Dezember 1984
Geburtsort: Hamburg
Eltern: Askan Duhnke, Unternehmensberatung
Karin Duhnke, gelernte Bankkauffrau
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNGSDATEN

1991 - 1995 Grund- und Hauptschule Appen
1995 - 2004 Theodor-Heuss-Schule, Pinneberg
06/2004 Abitur (Abschlussnote: 1,7)
seit 10/2005 Medizinstudium an der Universität Hamburg
08/2007 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: 3,0)

QUALIFIKATIONEN

07-09/2005 Krankenpflegepraktikum im Albertinen-Krankenhaus (Hamburg)
10-11/2008 Famulatur (Andrologie) im UKE (Hamburg)
07-08/2009 Famulatur (Kinderchirurgie) im Altonaer Kinderkrankenhaus (Hamburg)
08-09/2009 Praxisfamulatur (Allgemeinmedizin und Dermatologie) bei Dr. med. M. Gerber (Burg auf Fehmarn)
02/2010 Famulatur (Chirurgie) im St. Vincent's Hospital (Sydney, Australien)
04-07/2010 Wahlfach (Pädiatrie) im AKK (Hamburg)
08-10/2010 Allgemein Chirurgie (geteiltes PJ-Tertial) im New Somerset Hospital (Kapstadt, Südafrika)
10-12/2010 Unfallchirurgie (geteiltes PJ-Tertial) im Berufsgenossenschaftlichen Unfallkrankenhaus Hamburg
12/2010 - 03/2011 Innere Medizin (PJ-Tertial) im Schön Klinikum Eilbek (Hamburg)
seit 03/2011 Anästhesiologie (PJ-Tertial) im Regio-Klinikum Pinneberg

ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 30. Mai 2011

Jennifer Duhnke