

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus der Abteilung für Andrologie

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

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

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

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

## **Untersuchungen zum Einfluss verschiedener experimenteller Faktoren auf die Reproduzierbarkeit und Sensitivität gängiger Methoden zur DNA- Fragmentationsanalyse an Spermien beim Menschen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Dokortitels der Medizin  
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Xenia Demtschenko  
aus Charkiw/Ukraine

Hamburg 2012

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.07.2013**

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

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Wedegärtner**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:**

**INHALTSVERZEICHNIS**

**1 EINLEITUNG..... 1**

**1.1 Männliche Infertilität..... 1**

**1.2 Entstehung von DNA-Fragmentation in Spermien..... 1**

    1.2.1 Defekte in der Chromatinkondensation ..... 2

    1.2.2 Apoptose ..... 2

    1.2.3 Reaktiver oxidativer Stress (ROS) ..... 3

    1.2.4 Reparaturmechanismen und Prävention der DNA-Fragmentation ..... 4

**1.3 Tests zur Bestimmung von DNA-Fragmentation in Spermien ..... 5**

    1.3.1 TUNEL ..... 5

    1.3.2 COMET-Assay ..... 6

    1.3.3 Spermien-Chromatin-Struktur-Assay (SCSA) ..... 7

    1.3.4 *Sperm chromatin dispersion* (SCD) oder Halosperm-Test ..... 8

    1.3.5 *Sperm-hyaluronan binding assay* oder PICSI-Schale ..... 8

**1.4 Korrelation zwischen DNA-Fragmentation und konventionell erhobenen Ejakulatparametern..... 9**

**1.5 Stellenwert der Spermien-DNA-Fragmentation für die Methoden der assistierten Reproduktion.... 9**

**1.6 Arbeitshypothese und Fragestellung..... 10**

**2 MATERIALIEN UND METHODEN..... 11**

**2.1 Materialien ..... 11**

    2.1.1 Präparate ..... 11

    2.1.2 Chemikalien ..... 11

    2.1.3 Puffer und Lösungen..... 12

    2.1.4 Antikörper und Färbekomplexe ..... 13

    2.1.5 Verbrauchsmaterialien ..... 14

    2.1.6 Geräte..... 16

    2.1.7 Computeranwendungen ..... 18

**2.2 Methoden..... 19**

    2.2.1 Aufarbeitung der Präparate ..... 19

        2.2.1.1 Ejakulat-Ausstriche ..... 19

        2.2.1.2 Ausstriche aus Gewebeproben ..... 19

    2.2.2 Fixierungen ..... 20

        2.2.2.1 Paraformaldehyd 4% (PAF 4%) und modifizierte Carnoy-Fixierung ..... 20

        2.2.2.2 Erarbeitung einer modifizierten Fixierungsmethode mittels Mikrowelle..... 21

    2.2.3 Verwendung von Objektträgern und Beschichtungen ..... 21

        2.2.3.1 Beschichtung mit Poly-L-Lysin-Lösung ..... 22

        2.2.3.2 Auswertung: Vergleich der Objektträger und Beschichtungen ..... 22

        2.2.3.3 Verwendung der Hybridisierungskammer HybriWell..... 22

        2.2.3.4 Modifikation des Objektträgers mit Tesafilm ..... 23

2.2.3.5 Einfluss der Höhe der Flüssigkeitssäule .....	24
2.2.4 Färbungs-Reaktionen .....	25
2.2.4.1 TUNEL .....	25
2.2.4.2 SCSA mittels AO-Färbung .....	26
2.2.5 Modifikationen der TUNEL-Reaktion .....	28
2.2.5.1 Permeabilisationslösungen 1 vs. 2 .....	28
2.2.6 PICSI-Schale .....	29
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Vergleich von TUNEL-Test und SCSA/AO-Test .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 AxioVision – Computerprogramm zur Quantifizierung von Zellen .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Optimierung der Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.3.1 Einfluss der Dauer der Mikrowellenfixierung auf die Spermienhaftung .....	36
3.3.2 Einfluss der Dauer der Mikrowellenfixierung auf die DNA-Fragmentationsrate .....	37
3.3.3 Einfluss der Well-Konstruktionen mittels Tesafilm .....	37
3.3.4 Vergleich der Einflüsse von Mikrowellenfixierung und 4% PAF .....	39
<b>3.4 Einflüsse der Permeabilisierung auf den TUNEL-Test .....</b>	<b>41</b>
3.4.1 Permeabilisationslösung 1 vs. Permeabilisationslösung 2 .....	41
3.4.2 Einfluss der Zitrat-Konzentration auf die DNA-Fragmentationsrate .....	43
3.4.3 Einfluss von Unebenheiten im Präparat .....	44
3.4.4 Einfluss des Einsatzes von DNase .....	46
<b>3.5 Untersuchungen der DNA-Fragmentation in Spermien aus Hodengewebe .....</b>	<b>48</b>
<b>3.6 DNA-Fragmentation Hyaluronat-bindender Spermien .....</b>	<b>49</b>
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Diskussion der einzelnen Methoden .....</b>	<b>54</b>
4.1.1 Probleme bei der computergestützten Bildauswertung .....	54
4.1.2 Vergleichbarkeit von SCSA- und TUNEL-Test .....	55
4.1.3 Modifikationen des TUNEL-Tests, Problematik des Objektträger-Verfahrens .....	56
4.1.4 Mikrowellenfixierung .....	57
4.1.5 Einfluss des pH-Wertes auf die DNA-Fragmentationsrate .....	58
4.1.6 Bewertung verschiedener Kontrollen des TUNEL-Tests .....	58
<b>4.2 DNA-Fragmentation in testikulären Spermien? .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3 Spermien-Selektion mit Hilfe der PICSI-Schale? .....</b>	<b>59</b>
<b>4.4 Schlussfolgerung .....</b>	<b>60</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1 Ausblick .....</b>	<b>63</b>

<b>6 SUMMARY .....</b>	<b>65</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>67</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>69</b>
<b>9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>75</b>
<b>10 DANKSAGUNG.....</b>	<b>79</b>
<b>11 EIDELSTAATLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>80</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Männliche Infertilität

Nach Schätzungen der World Health Organization (WHO) steigt die Zahl infertiler Paare pro Jahr weltweit um 2 Millionen. In Deutschland trifft dies etwa auf jede siebte Partnerschaft zu. Dabei rechnet man in bis zu 50 % der Fälle mit einer alleinigen oder partiellen Verursachung durch den Mann. In den Industrieländern geht man gegenwärtig von einer durchschnittlichen Prävalenz der männlichen Infertilität von 14 % aus (zusammengefasst in Paasch *et al.*, 2007). Dabei können unterschiedlichste Faktoren eine ursächliche Rolle spielen. Endokrinologische Störungen sind eher selten. Neben den vorherrschenden testikulären Funktionsstörungen ist auch an systemische Erkrankungen, anatomische und genetische Störungen, sowie an vielfältigste Lifestyle – und Umweltfaktoren zu denken (Nieschlag *et al.*, 2009).

Normale Spermioogramme sind keine Garantie für das Eintreten einer Schwangerschaft. Deshalb werden Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch neben den andrologischen Basisabklärungen bestehend aus einer Anamnese und einem diagnostischen Spermioogramm zusätzliche Untersuchungen zur männlichen Fertilitätsabklärung angeboten, z.B. solche, mit denen sich der Fragmentierungsgrad der Spermien-DNA bestimmen lässt. Bereits 1980 stellte Donald P. Evenson einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Fragmentation der Spermien-DNA und einer geringeren Schwangerschaftsrate her. Es gibt gegenwärtig intensive Bemühungen, derartige Untersuchungen in die andrologische Routinediagnostik zu integrieren. Diese Bemühungen sind aber umstritten, da die klinische Relevanz der DNA-Fragmentation weiterhin unklar ist (zusammengefasst in Zini & Sigman, 2009; Tamburrino *et al.*, 2012).

## 1.2 Entstehung von DNA-Fragmentation in Spermien

Spermien infertiler Männer zeigen oft einen erhöhten Anteil an DNA-Strangbrüchen. Wenn im Ejakulat weniger als 15% Spermien mit DNA-Fragmentation vorzufinden sind, geht man in der Regel von einer normalen Zeugungsfähigkeit aus. Bei mehr als 30% Spermien mit fragmentierter DNA ist die Zeugungsfähigkeit dagegen deutlich vermindert (Evenson *et al.*, 1999). Indikationen für die Ermittlung der DNA-Fragmentation in Spermien sind u.a. Leukospermie, Teilungsversagen, Implantationsversagen, habituelle Aborte, Alter des Mannes > 50 Jahre, vorausgegangene Chemo- oder Radiotherapie.

Der DNA-Fragmentation können intratestikuläre oder posttestikuläre Ursachen zugrunde liegen. Sie können während der Spermatogenese oder posttestikulär während der Nebenhodenpassage und in ejakulierten Spermien entstehen. Auch Aufbereitungsverfahren von Spermien wie die Kryokonservierung können zu DNA-Schäden führen (Aitken & Baker, 2006). Unter einer DNA-Fragmentation werden Strangbrüche verstanden, die

entweder als Brüche in einem einzelnen DNA-Strang („*single stranded break*“) oder in beiden Strängen („*double stranded breaks*“) der DNA-Doppelhelix auftreten können.

Derzeit werden im Wesentlichen drei Theorien zur Entstehung von DNA-Fragmentation in Spermien favorisiert: (1) Defekte in der Chromatinkondensation, (2) Apoptose und (3) oxidativer Stress (Angelopoulou *et al.*, 2007).

### 1.2.1 Defekte in der Chromatinkondensation

Der Einfluss der Chromatinstruktur auf die Entstehung von DNA-Schäden ist bis heute unbekannt. Die Kondensation des Chromatins im Spermienkopf ist eine Folge des Austausches DNA-bindender Histone gegen Protamine, der beim Menschen normalerweise zu etwa 85 % erfolgt (zusammengefasst in Stegner *et al.*, 2005). Ein unvollständiger Histon/Protamin-Austausch führt zu einer Störung der Spermienfunktion und schließlich zur Infertilität.

Die DNA-Defekte entstehen u.a. durch die Aktivität des Enzyms Topoisomerase II. Es erzeugt DNA-Nicks (Einzelstrangbrüche), vermutlich, um die Spannung der DNA-Helix beim Ersatz von Histonen durch Protamine zu vermindern. Die Topoisomerase II ist ebenso für die Reparatur der DNA-Nicks zuständig (Marcon & Boissonneault 2003). Die Empfindlichkeit der Spermien-DNA gegenüber der Topoisomerase II scheint mit abnehmender Protaminbeladung zuzunehmen (zusammengefasst in Paasch *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Beobachtungen kann das Auftreten von DNA-Fragmentation als Anzeichen einer unvollständigen Spermienreifung und insbesondere als Folge einer defekten Chromatinverpackung während der Spermatogenese aufgefasst werden. In diesem Zusammenhang erscheint bedeutsam, dass mittels testikulärer Spermienextraktion (TESE) aus dem Hoden gewonnene Spermien eine erhöhte DNA-Fragmentation aufweisen können, wenn eine primäre Funktionsstörung des Hodens vorliegt (Meseguer *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose steht für den „programmierten“ Zelltod. Zu Beginn des Vorgangs schrumpft die betroffene Zelle, da die Proteine des Cytoskeletts von Cysteinproteasen, sog. Caspasen gespalten werden. Es folgen die Chromatinkondensation und die endonukleolytische Spaltung der DNA, worauf sich der Zellkern auflöst. Der Prozess kann auf extrinsischen und intrinsischen Wegen induziert werden und läuft energieabhängig ab. Er trägt im Keimepithel des Hodens dazu bei, die Zellzahl zu kontrollieren und die Homöostase während der Spermatogenese zu erhalten, indem entartete oder geschädigte Zellen gezielt absterben.

Auslöser der Apoptose sind die oben erwähnten Caspasen (Cystein-abhängige Aspartat-spaltende Proteasen) (Bonfoco, 2001). Diese werden auf extrinsischem Weg über Fas-Rezeptoren („Todesrezeptoren“) und den Liganden FasL aktiviert (Nieschlag *et al.*, 2009).

Der intrinsische Weg läuft über die Aktivierung von Initiator-Caspasen, die wiederum Effektor-Caspasen aktivieren. Diese spalten zelleigene Proteine oder aktivieren Nukleasen, die die DNA spalten (Paasch *et al.*, 2005). Bei einer normal ablaufenden Spermatogenese sind nur wenige Spermien mit Fas-Rezeptoren zu finden. Fas<sup>+</sup>-Spermien treten vor allem in der Fraktion der unreifen Zellen auf, die zusätzlich eine hohe Anzahl aktivierter Caspasen enthält. Bei infertilen Patienten erhöht sich das Vorhandensein von Fas<sup>+</sup>-Spermien auf bis zu 50 %. Als Ursache hierfür gilt eine gestörte und inkomplette Apoptose während der Spermatogenese (Sakkas *et al.*, 1999b). Um diese Hypothese zu beschreiben, führten Sakkas *et al.* den Begriff der „abortiven Apoptose“ ein (Sakkas *et al.*, 1999a). Es bleibt aber ungewiss, ob die Apoptose-Anzeichen aus einer unvollständigen Apoptose im Hoden herrühren oder ob die ejakulierten Spermien die Fähigkeit zur Aktivierung der apoptotischen Kaskade beibehalten. Tatsächlich zeigt die Relation zwischen der DNA-Fragmentationsrate und der Anzahl apoptotischer Marker nicht den erwarteten engen Zusammenhang (Sakkas *et al.*, 2002).

### 1.2.3 Reaktiver oxidativer Stress (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS), - auch oft ungenau als „Sauerstoffradikale“ bezeichnet-, sind für den Organismus schädliche Formen des Sauerstoffs, die bei oxidativem Stress auftreten. Trotz ihrer kurzen Halbwertszeit sind sie in der Lage, mit Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren zu reagieren und erhebliche Schäden zu verursachen. Zu den Folgen des oxidativen Stresses gehören die Lipidperoxidation (die letztlich dazu führt, dass Zellen mehr Energie aufwenden müssen, um ihr Membranpotenzial zu stabilisieren), die Proteinoxidation und die Schädigung der DNA. Hierzu zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche. ROS spielen bei verschiedensten Erkrankungen sowie beim Altern eine wesentliche pathophysiologische Rolle. Als Ursachen werden Infektionen des Genitaltrakts, Varikozele und die Exposition gegenüber Xenobiotika und anderen Schadstoffen aus der Umwelt diskutiert.

Eine hohe ROS-Produktion im Ejakulat verursacht oxidative Membranschäden und eine verminderte Spermienfunktion sowie DNA-Schäden in Mitochondrien und im Zellkern. Man assoziiert die Auswirkungen mit erniedrigter Fertilität, Beeinträchtigung der embryonalen Entwicklung, Fehlgeburten und kindlichen Erkrankungen. Es wird angenommen, dass ROS in physiologischen Konzentrationen, die nicht näher definiert sind, zur normalen Spermienfunktion gehören (De Iuliis *et al.*, 2006) und sogar essenziell für die Akrosomreaktion, Motilität und Kapazitation sind (Agarwal *et al.*, 2007). Als primäre ROS-Quelle wird das Ejakulat selbst angesehen. Daneben führt eine bei Entzündungen erhöhte Anzahl an polymorphkernigen Leukozyten zu einer erhöhten ROS-Produktion. Ein weiterer Beleg für die Bedeutung der ROS ist die Beobachtung, dass eine Behandlung mit Antioxidantien vor DNA-Fragmentation schützen kann. Noch ist unklar, warum defekte Spermien hohe Mengen an ROS produzieren (Angelopoulou *et al.*, 2007).



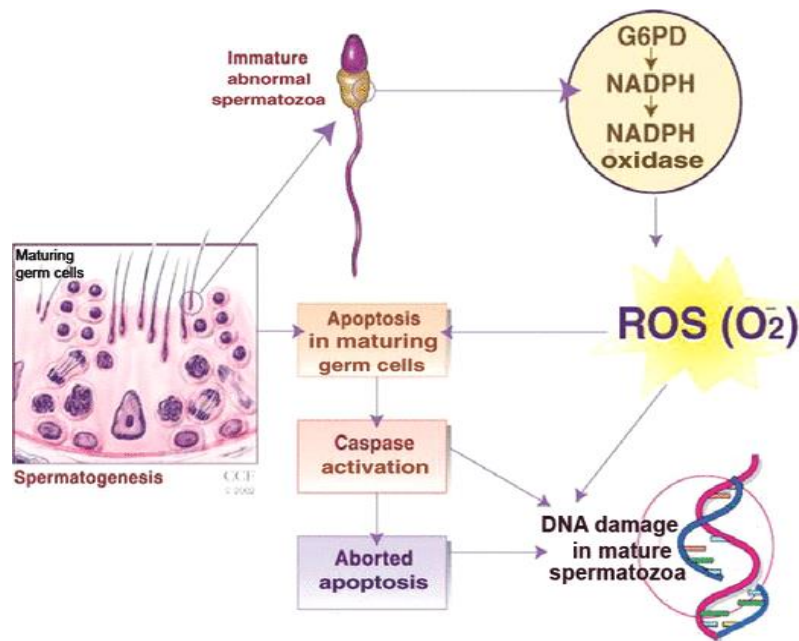


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Entstehung von DNA-Fragmentation durch ROS [aus Agarwal et al. American Journal of Reproductive Immunology 59 (2008) 2-11].

#### 1.2.4 Reparaturmechanismen und Prävention der DNA-Fragmentation

Zellen und Gewebe stehen verschiedene Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress zur Verfügung (Rhee, 1999; Schmidt, 2007):

1. Antioxidatives Schutzsystem; enzymatische und nicht-enzymatische Radikalfänger und Antioxidantien
2. Sekundärer Schutz; Reparaturmechanismen der DNA und geregelter Abbau von Proteinen (*turnover*)

DNA-Reparaturmechanismen sind sowohl auf Seiten der Spermien als auch der befruchteten Eizelle vorhanden. Im Vergleich zu somatischen Zellen zeigte sich das Kerngenom von Spermien als deutlich resistenter gegenüber oxidativen Stress. Als Grund hierfür nimmt man die außergewöhnlich dichte Verpackung des Chromatins an (Aitken & Baker, 2006). Im Unterschied dazu ist die Spermienmembran aufgrund eines hohen Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren stark anfällig für ROS, was in einer Lipidperoxidation mit Verminderung der Spermienqualität bis hin zum Zelltod führen kann (Zini *et al.*, 2010). Als Gegengewicht wirken jedoch endogene Schutzfaktoren (Rhemrev *et al.*, 2001).

Aus Studien mit DNA-geschädigten Spermien hinsichtlich eines ICSI-Erfolges (ICSI= intracytoplasmatische Spermieninjektion) geht hervor, dass die außergewöhnliche DNA-Reparaturkapazität der Eizelle zum Fertilisierungserfolg beitragen kann. Hierbei kommt es insbesondere auf das Verhältnis zwischen dem Ausmaß des DNA-Schadens der Spermien und der Reparaturkapazität der Eizelle an (Gandini, 2004). Letztere hängt ab von der zellulären Qualität, dem Alter der Frau und dem ovariellen Milieu (Meseguer *et al.*, 2011).

### 1.3 Tests zur Bestimmung von DNA-Fragmentation in Spermien

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden mehrere unterschiedliche Testsysteme zum Nachweis und zur Quantifizierung der DNA-Fragmentation in Spermien entwickelt. Diese Tests untersuchen unterschiedliche Parameter, woraus sich bereits eine Heterogenität in den Ergebnissen und den Schlussfolgerungen ergibt. Es ist daher wichtig zu wissen, was genau der eingesetzte Test erfasst. Zum einen erheben Tests wie TUNEL [*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling assay*], COMET-Assay (unter neutralen Bedingungen) und *in situ nick translation assay* die tatsächlich vorhandene DNA-Fragmentation. Tests wie SCSA [*sperm chromatin structure assay*] mit Acridinorange-Test (AO), COMET-Assay (unter alkalischen oder sauren Bedingungen) und SCD [*sperm chromatin dispersion test*], untersuchen dagegen die Suszeptibilität der DNA gegenüber Fragmentationen (Alvarez, 2005). Zu erwähnen ist auch der *sperm-hyaluronan binding assay* (HBA, dt. Hyaluronsäurebindungs-Test) als ein Mittel zur Selektion intakter Spermien.

#### Nachweise von tatsächlich vorliegender DNA-Fragmentation

##### 1.3.1 TUNEL

TUNEL steht für *Deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP nick end labeling*. Der Test quantifiziert den Einbau von deoxyUTP in Einzel- und Doppelstrang-DNA-Brüche, genauer in die freien 3'-OH-Gruppen. Die Reaktion wird vom Enzym terminale *Deoxynucleotidyl-transferase* (TdT) katalysiert. Gebundenes dUTP kann mithilfe eines Antikörpers markiert und mikroskopisch oder in der Durchflusszytometrie gemessen werden. Spermien, die keine DNA-Brüche aufweisen, haben nur eine Hintergrundfärbung (Gorczyca *et al.*, 1993).

Im klinischen Gebrauch wird TUNEL vielfach zur Ejakulat-Untersuchung eingesetzt. Dazu werden die Spermien auf Objektträgern fixiert und nach erfolgter TUNEL-Reaktion visuell untersucht. Ein hoher TUNEL-Wert korreliert mit verringerter Spermien-Motilität, schlechter Spermien-Morphologie und einer verringerten Spermien-Konzentration. Des Weiteren scheint er ein potenziell prädiktiver Wert für das Ergebnis von assistierten Reproduktionstechniken (ART) zu sein und korreliert mit dem wiederholtem Verlust von Schwangerschaften (Sun *et al.*, 1997; Benchaib, 2003). Für die Auswertung am Mikroskop gibt es unterschiedliche Einschätzungen. Einige Autoren berichten über eine gute Reproduzierbarkeit, Empfindlichkeit und Spezifität (Barroso, 2000), andere äußern Zweifel (Evenson *et al.*, 2002a).

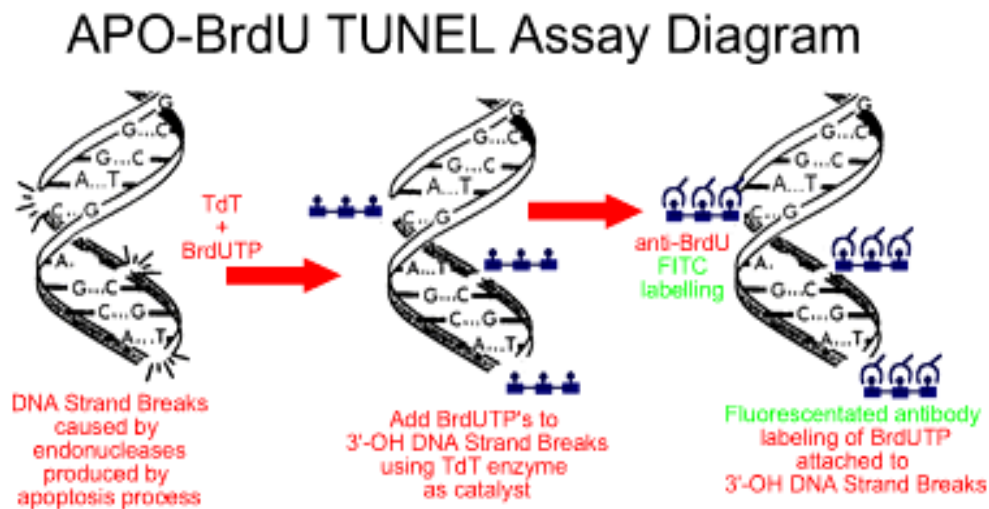


Abb. 1.2: Funktionsweise des TUNEL-Tests [<https://www.pharmatching.com/company/phenix-flow-systems-inc>].

### 1.3.2 COMET-Assay

Der COMET-Assay ist eine elektrophoretische Methode zur Analyse der DNA-Fragmentation in einzelnen Zellen, die sich auch für Ejakulatanalysen eignet. Nach der *in-situ*-Lyse der Spermien (zur Entfernung von DNA-gebundenen Proteinen und zur Lockerung der dichten Chromatin-Verpackung) findet die Elektrophorese in einem Agarosegel statt, je nach Methode entweder in neutralem oder alkalischem Puffer. Dabei wird ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR Green I) eingesetzt, der an die DNA bindet. Die Auswertung erfolgt mithilfe der Fluoreszenzphotografie (Singh *et al.*, 1988). Es resultieren Kometen-artige Spermienköpfe, wobei die Länge des Kometenschwanzes als Maß der DNA-Fragmentation herangezogen wird (Hellman *et al.*, 1995). Der neutrale Elektrophorese-Puffer dient der Detektion vorhandener Doppelstrangbrüche in der DNA. Mithilfe des alkalischen Puffers wird die Detektion von Einzelstrangbrüchen möglich (Singh *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 1989). Der Test wird heute vor allem zur Bestimmung von DNA-Fragmentation nach Kryokonservierung von Spermien eingesetzt. Des Weiteren wird er für Vorhersagen des möglichen Erfolges von IVF (*In-vitro*-Fertilisation) und ICSI (Intrazytoplasmatische Spermieninjektion) herangezogen (Hellman *et al.*, 1995; Morris, 2002; Tomsu, 2002). Die COMET-Methode untersucht einzelne Zellen und ist abhängig vom subjektiven visuellen Eindruck des Beobachters; Abweichungen in den Ergebnissen sollen durch eine computergestützte Auswertung gemindert werden.

## Bestimmungen der Suszeptibilität für DNA-Fragmentation

### 1.3.3 Spermien-Chromatin-Struktur-Assay (SCSA)

Dieser Test gilt derzeit als Goldstandard für DNA-Fragmentationsmessungen an Spermien. Der metachromatische Farbstoff Acridin Orange (AO) wird dazu an denaturierte Spermien-DNA gebunden. AO lagert sich an doppelsträngige DNA als Monomer an, dagegen bindet es einsträngige DNA als Polymer (Darzynkiewicz *et al.*, 1976; Kosower *et al.*, 1992). Eine grüne Fluoreszenz zeigt intakte doppelsträngige DNA an, rote Fluoreszenz zeigt dagegen Bindung an DNA-Bereiche, in denen Einzelstränge vorliegen. Die einfache visuelle Auswertung, auch als Akridinorange-Test (AOT) bezeichnet, beinhaltet dasselbe methodische Grundprinzip, macht aber Probleme bei der Reproduzierbarkeit. Bei SCSA erfolgt die Datenanalyse mittels Durchflusszytometrie; das Verhältnis von Rotfluoreszenz zur Gesamtfluoreszenz wird als DNA-Fragmentations Index (DFI) angegeben (Evenson *et al.*, 1980). Es wird vielfach davon ausgegangen, dass der SCSA-DFI der zuverlässigste Parameter für eine Vorhersage des ART-Ergebnisses ist, einschließlich der Prognosen bezüglich Fertilisation und Implantationsraten. Zur Differenzierung zwischen fertilen und infertilen Patienten wurde ein Grenzwert von 30 % DFI festgelegt (Evenson & Wixon, 2005).

Ein weiterer Parameter, der sog. HDS (*high DNA stainability*) erfasst Zellen mit stark gefärbter DNA und ist unabhängig vom DFI. Die intakte doppelsträngige DNA in den stark gefärbten Spermien ist aufgrund einer abweichenden Histon-Protamin-Transition vermehrt anfärbbar (Evenson *et al.*, 2002a). Der finanzielle Aufwand ist aufgrund der durchflusszytometrischen Auswertung hoch und kann nicht von jedem andrologischen Labor aufgebracht werden.

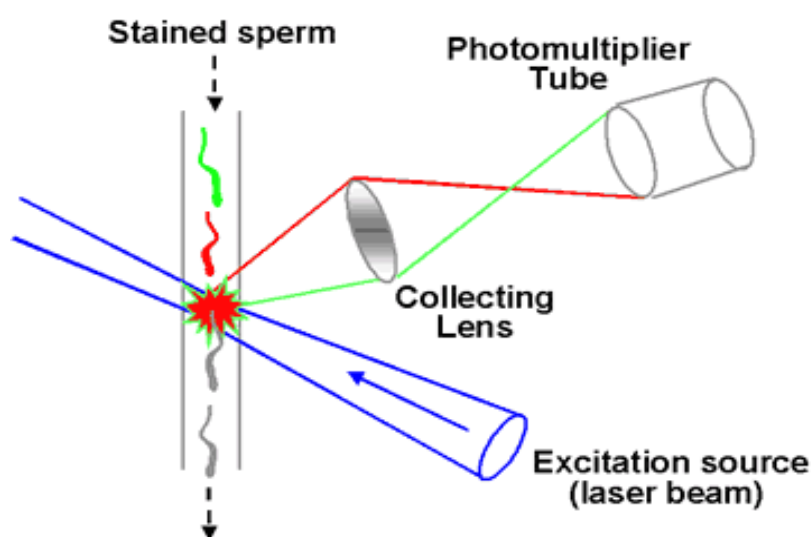


Abb. 1.3: Funktionsweise der flowcytometrischen Differenzierung von Spermien nach SCSA-Färbung [<http://www.ohsu.edu/xd/health/services/women/services/fertility/fertility-services/lab-services/images/62.gif>].

### 1.3.4 *Sperm chromatin dispersion (SCD) oder Halosperm-Test*

Die Spermien-DNA entfaltet sich im sauren Milieu und legt sich in Form von Schleifen (Halo) um den Spermienkopf. Bei Spermien mit fragmentierter DNA bilden sich diese Schleifen nicht oder nur sehr schwach aus. Daher findet man hier keinen Halo. Der visuelle Test ist einfach, kostengünstig, schnell und reproduzierbar und liefert anscheinend mit SCSA vergleichbare Ergebnisse (Evenson & Wixon, 2005). Genauere Daten über Grenzen und Möglichkeiten dieses Tests in Kliniken liegen aber noch nicht vor.

## Weitere Spermien-Funktionstests

### 1.3.5 *Sperm-hyaluronan binding assay oder PICSI-Schale*

Der Test basiert auf Forschungsergebnissen, die belegen, dass funktionell reife und strukturell intakte Spermien an Hyaluronat binden. Hyaluronat ist ein Hauptbestandteil der Hülle (Cumuluszellen und extrazelluläre Matrix), die die Eizelle umgibt. Der Kopf eines reifen Spermiums trägt einen Hyaluronat-spezifischen Rezeptor, durch den eine Bindung an eine mit Hyaluronat beschichtete Oberfläche möglich wird (Huszar *et al.*, 2003). Die an eine Hyaluronat-Beschichtung, z.B. in der PICSI-Schale (PICSI = physiologische ICSI) gebundenen Spermien zeigen also ein Verhalten, das mit dem natürlichen Befruchtungsgeschehen verglichen werden kann. Im Unterschied dazu binden unreife oder beschädigte Spermien nicht. Diese Art der positiven Spermiselektion ist vor allem bei der assistierten Reproduktion (engl. ART, *assisted reproductive technology*) von großem Interesse, insbesondere bei der ICSI, die auf der Injektion eines einzelnen Spermiums in den Oozyten basiert (Jakab *et al.*, 2005). Über die klinische Relevanz dieses Tests existieren allerdings unterschiedliche Aussagen (vgl. Jakab und Nijs). Diese Selektion fand bis vor kurzem noch Anwendung in einigen reproduktionsmedizinischen Zentren (Razavi *et al.*, 2010). Allerdings wurde die Produktion von PICSI-Schalen in Deutschland mittlerweile eingestellt.

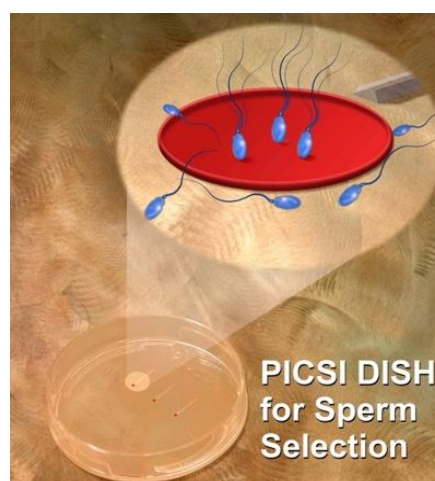


Abb. 1.4: Prinzip der PICSI-Schale. Rot dargestellt ist ein HA-Mikrotropfen mit gebundenen Spermien. [<http://www.abingtonreproductivemedicine.com/Websites/abington/images/PICSI.jpg>].

## **1.4 Korrelation zwischen DNA-Fragmentation und konventionell erhobenen Ejakulatparametern**

Zini *et al.* (2001) untersuchten den Zusammenhang zwischen der DNA-Integrität bzw. der DNA-Fragmentation und konventionell erhobenen Ejakulatparametern wie Spermienkonzentration, -Motilität und -Morphologie. Ihrer Studie zufolge korrelieren DNA-Denaturation und -Fragmentation stark ( $r=0.71$ ,  $P<0.0001$ ) mit diesen Parametern. Als Kernaussage ergab sich eine Korrelation mit verminderter Spermienkonzentration und der schlechten Morphologie, die stärkste Korrelation ergab sich mit einer verminderten Spermienmotilität (Zini, 2001b). Aussagen anderer Autoren zufolge ist die DNA-Fragmentationsrate dagegen ein von anderen Parametern unabhängige Eigenschaft der Spermien, die beispielsweise einer idiopathischen männlichen Infertilität zugrunde liegen könnte.

Zum aktuellen Zeitpunkt sind die publizierten Daten zur Korrelation zwischen Standardspermiogramm-Parametern und DNA-Fragmentation kontrovers und ein Grenzwert, der die Fertilität signifikant einschränkt, nicht eindeutig definiert. Dennoch konnte mit verschiedenen Verfahren bei infertilen Männern mit nach WHO-Kriterien schlechten Standardspermiogramm-Parametern ein nachweislich erhöhter Grad der DNA-Fragmentation ermittelt werden. Studien mit SCSA zeigten, dass bei einem  $DFI \geq 27\%$  eine Schwangerschaftsinduktion auf natürliche Weise höchst unwahrscheinlich ist (Larson-Cook, 2003).

## **1.5 Stellenwert der Spermien-DNA-Fragmentation für die Methoden der assistierten Reproduktion**

Kommt es bei Paaren mit Kinderwunsch auf natürlichem Wege nicht zu einer Schwangerschaft, kann ihnen in bestimmten Fällen mithilfe von Techniken der assistierten Reproduktion (ART) geholfen werden. Es liegen Angaben vor, dass 1 von 80 in den USA geborenen Kindern, 1 von 40 in Australien und 1 von 24 in Dänemark mithilfe von ART gezeugt wurden. Insgesamt wurden bereits mehr als 3 Millionen Babys mithilfe von ART auf die Welt gebracht (Aitken *et al.*, 2009). Das erste „IVF-Baby“ war Louise Brown, geboren 1978 in Großbritannien. Einer der Faktoren, die über den ART-Erfolg entscheiden, ist die Qualität der Spermien. Bei der Intrauterinen Insemination (IUI), der In vitro-Fertilisation (IVF) und der Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) beseitigt man zunehmend biologisch vorgegebene „Hindernisse“, welche die Spermien normalerweise im männlichen sowie im weiblichen Reproduktionstrakt bis zur Befruchtung überwinden müssen.

Trotz aller Fortschritte werden aber auch nach mehreren IVF- oder ICSI- Zyklen „nur“ rund 40 Prozent der Kinderwunschaare tatsächlich Eltern. Die physische und psychische Belastung ist hoch, die Kosten werden nur zum Teil von den Krankenkassen getragen. Es

ist somit lohnenswert, die Erfolgchancen zu erhöhen, indem die einzelnen Faktoren optimiert werden.

Nach bisherigem Forschungsstand werden DNA-Schäden in Spermien als ein potentielles Risiko für reduzierte Implantationsraten, schlechte Embryoqualität und erhöhte Abortraten diskutiert. Bemühungen, die Untersuchung der DNA-Fragmentation in Spermien in die andrologische Routinediagnostik zu integrieren, scheitern aber bisher an der Verwendung schwer vergleichbarer Methoden (s.o.). So lange dies der Fall ist, scheint eine Akzeptanz dieser Tests im klinischen Gebrauch erschwert.

### **1.6 Arbeitshypothese und Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, DNA-Fragmentationsmessungen in Spermien zu vereinfachen und ihre Vergleichbarkeit zu verbessern. Aufgrund der bestehenden Vielfalt der Verfahren (s.o.), ihrer divergierenden Ergebnisse und ihrer zunehmenden Bedeutung im Zusammenhang mit ART erscheint es wichtig, Grundlagen für eine verbesserte Reproduzierbarkeit und größere Empfindlichkeit zu erarbeiten. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Verfahren eingesetzt: der TUNEL-Test und der SCSA-Test. Ziel war es, die verschiedenen Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen können, näher zu charakterisieren.

Die Variation dieser Faktoren kann nicht nur zur Heterogenität zwischen verschiedenen Verfahren, sondern auch zu Abweichungen innerhalb desselben Tests führen. Zusätzlich sollte eine neue Fixationsmethode für Spermien mittels Mikrowelle erprobt und mit den Ergebnissen aus chemischen Fixierungen verglichen werden. Gründe hierfür sind eine einfachere, schnellere und kostengünstigere Durchführung und die Hoffnung auf einen geringeren Einfluss auf die Spermien (-DNA). Diesem Ziel sollte auch der Einsatz von Methoden dienen, die sich auf Objektträgern durchführen lassen und keine kostenträchtige Durchflusszytometrie benötigen.

Des Weiteren sollte eine nähere Begutachtung der HA-Methode in PICSI-Schalen mithilfe der TUNEL-Methode erfolgen. Überprüft werden sollte auch, ob Patienten mit obstruktiver Azoospermie, unabhängig von der Fixationsmethode der Spermien - wie in der Literatur häufiger beschrieben - eine erniedrigte intratestikuläre Spermien-DNA-Fragmentationsrate gegenüber Ejakulaten aufweisen. Nach Möglichkeit sollten die vorherrschenden Ursachen für die Variabilität der DNA-Fragmentationsmessungen definiert werden, so dass verbesserte Methoden auf dieser Grundlage etabliert werden können. Zum Schluss sollte eine kritische Evaluation der Methoden erfolgen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Präparate

Die untersuchten Ejakulate stammen von Patienten aus der Sprechstunde der Abteilung für Andrologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. med. W. Schulze). Routinemäßig werden diese durch Masturbation gewonnen und anschließend im Rahmen eines Spermioграмms nach WHO-Richtlinien untersucht. Für die Ejakulatproben bestanden in den nachfolgenden Versuchen keine weiteren Ausschlusskriterien.

Die Hodenbiopsien wurden im Rahmen der Hamburger TESE-Prozedur (TESE = testikuläre Spermienextraktion) (Schulze *et al.*, 1999) entnommen. Ob die Biopsien sich für eine ICSI und auch für die nachfolgend beschriebenen Versuche eignen, wurde im Rahmen einer postoperativen sog. Test-TESE nach ca. 30-minütigem Kollagenase-Verdau (entsprechend den Laborstandards zur vollständigen Beseitigung des Bindegewebes) unter dem Mikroskop untersucht. Ausgewählt wurden Biopsien mit einem histologisch verifizierten modifizierten Johnsen-Score von 10, d.h. mit qualitativ und quantitativ regelrechter Spermatogenese (vergleiche De Kretser & Holstein, 1976; Schulze *et al.*, 1999). Diese enthielten eine ausreichende Anzahl an reifen Spermatozoen bzw. testikulären Spermien für die geplante Versuchsdurchführung (siehe unten).

Für die Versuche wurden die Proben nach der Entnahme in einem 1,5 ml-Röhrchen für ca. zwei Stunden mit Kollagenase und SpermPrep (8 mg Kollagenase auf 1 ml SpermPrep) versetzt. Nach oder während der Durchführung des TUNEL- bzw. SCSA-/AO-Tests wurden die Ausstriche von Ejakulaten und Biopsien entweder mittels inversen Fluoreszenzmikroskops Olympus IX81 oder mittels des Lichtmikroskops Axiovert 100 untersucht.

Für die Entnahme und Untersuchung der Proben lagen die Zustimmungen der Patienten und der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg vor. (IB24-81/04)

#### 2.1.2 Chemikalien

Acridin orange solution (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstr. 2 D-89555 Steinheim
Zitronensäure	Merck-Schuchardt	Schuchardt, 85662 Hohenbrunn, Germany
DNase 1, Amplification Grade	Sigma	siehe Sigma-Aldrich



EDTA	Sigma	siehe Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth	Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck	siehe Merck-Schuhhardt
Hyaluronsäure aus Hahnekamm- Gewebe	Sigma-Aldrich	siehe Sigma-Aldrich
Na-Zitrat	Merck	siehe Merck-Schuhhardt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich	siehe Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin Lösung	Sigma-Aldrich	siehe Sigma-Aldrich
Proteinase K	Qiagen	Qiagen GmbH D-40724 Hilden
RNase Cocktail	Ambion	Ambion, Inc An Applied Biosystem Business
Salzsäure (HCL)	Merck	Merck KGAA Frankfurter Straße 250 64293 Darmstadt Germany
Triton X-100	Sigma-Aldrich	siehe Sigma-Aldrich
Turbo DNase	Ambion	Applied Biosystems Frankfurter Straße 129 B 64293 Darmstadt Germany

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma	siehe Sigma-Aldrich
PureSperm R Wash	Nidacon	Nidacon International AB, Flöjelbergsgatan 16B, SE- 43137 Mölndal Sweden
PureSperm R 100	Nidacon	siehe Nidacon

PureSperm R Buffer	Nidacon	siehe Nidacon
SpermPrep Media	Zavos Diagnostic Laboratories	ZDL, INC., 2134 Nicholasville road, STE 3, Lexington 40503, US
SCSA 1	Merck	siehe Merck
SCSA 2	Merck	siehe Merck

Modified Davidson's Lösung		30% Paraformaldehyd (37-40%) 15% Ethanol, absolut 5% Essigsäure 50% bidest. H <sub>2</sub> O
PAF / PBS		4% Paraformaldehyd 96% PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7.4
Permeabilisationspuffer	Zitratpuffer 1	0,1% Triton X-100 0,1% tri-Natriumcitrat-Dihydrat
	Zitratpuffer 2	0,1% Triton X-100 0,1% Zitronensäure

#### 2.1.4 Antikörper und Färbekomplexe

Acridin Orange	Sigma	siehe Sigma-Aldrich
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche	Roche Diagnostics GmbH Mannheim Germany

Acridin Orange Säure-Waschlösung	0.08 M HCL, pH 1.2 0.15 M NaCl 0.1% TritonX-100
Acridin Orange (AO) Färbelösung	6 µg AO pro ml Puffer

Zitrat-Puffer	0.037 M Zitronensäure 0.126 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.0011 M EDTA 0.15 M NaCl, pH 6.0
---------------	---

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Bioarray rack medium reagent reservoir	Creative Bioarray	Creative Bioarray, 45-16 Ramsey Road Shirley, NY 11967 USA
Bioarray rack larg reagent reservoir	Creative Bioarray	siehe Creative Bioarray
Bioarray position tool	Creative Bioarray	siehe Creative Bioarray
Bioarray removal tool	Creative Bioarray	siehe Creative Bioarray
Deckgläser	Menzel-Gläser	Gerhard Menzel GmbH, Saarbrückener Str. 248, D-38116 Braunschweig
100 farbfixierte Indikationsstäbchen pH-Fix 4.5-10.0 pH-Fix 0-14	Roth	siehe Roth
Handschuhe Peha-soft	Paul Hartmann	Paul Hartmann AG Paul-Hartmann-Straße 12 89522 Heidenheim Deutschland
Hybridisierungskammern HybriWell	Sigma-Aldrich	siehe Sigma-Aldrich
Hybri-well Press-seal hybridization chambers	Sigma-Aldrich	siehe Sigma-Aldrich
HybriSlip™ Hybridization Cover HS40 40 mm× 22 mm	Grace Bio-Labs	Grace Bio-Labs PO Box 238, Bend, OR 97709
Megafunnel Slide Chip	Shandon	Shandon GmbH Bernerstr. 53

		60437 Frankfurt am Main
Objektträger	Menzel-Gläser	siehe Menzel-Gläser
Objektträger Super Frost R Plus	Menzel-Gläser	siehe Menzel-Gläser
Objektträger	Shandon	siehe Shandon
PICSI-Schale	Gynemed Medizinprodukte	Gynemed GmbH & Co. KG, Lübecker Straße 9 23738 Lensahn
Pipetten 0,1-3 µl	Biohit Proline Plus	Gesellschaft für Medizin- und Labortechnik Fischerlehner & Kucera HandelsgesmbH Andreas-Hofer-Straße 3 A-6020 Innsbruck
Pipetten 2-20 µl	Eppendorf Reference	Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 Hamburg Deutschland
Pipetten 0,5-10 µl	Finnpipette ®	siehe Sigma-Aldrich
Pipette 20 / 200 / 2000 µl	Gilson	Gilson, Inc. 3000 Parmenter Street, P.O. Box 620027 Middleton, WI 53562-0027 USA
Pipettenspitzen	Biozym	Biozym, Industriegebiet Ost - Steinbrinksweg 27, Germany
Pipettenspitzen 20 µl	Gilson / Eppendorf Biosphere Quality Tips	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. D-51588 Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µl	Eppendorf Biosphere® Filter Tips	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. D-51588 Nümbrecht
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf	siehe Eppendorf Reference

2,0 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf	siehe Eppendorf Reference
15 ml-Reaktionsgefäße	Greiner	Greiner Bio-One GmbH Maybachstrasse 2 72636 Frickenhausen Deutschland
Pestell DSTROY-SR UND (Reaktionsgefäß 1,6 mL)	Biozym	Biozym Diagnostik GmbH D-31833 Hess Oldendorf
Spitzenaufsatzfilter Minisart	Sartorius	Sartorius Stedim Biotech S.A., Zone Industrielle des Paluds, Avenue de Jouques, BP 1051, 13781 Aubagne Cedex, France
Zellsieb 70 µm	BD Falcon TM	BD Bioscience Europe POB 13, Denderstraat 24 B-9320 Erembodegem, Belgium
µ-Dish 35mm, high	ibidi	Ibidi GmbH, Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried / Menich, Germany

### 2.1.6 Geräte

Brutschrank Hybridiser HB-1D	Techne	Bibby Scientific Limited, Beacon Road, Stone, Staffordshire ST15 0SA, UK
DAKO Pen	DAKO	Pathology Products Dako Deutschland GmbH Neue Flora Stresemannstraße 161 D-22769 Hamburg
Feinwaage 1615 MP	Sartorius AG	siehe Sartorius
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81	Olympus	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Johann- Krane-Weg 39

		48149 Münster
Heizrührer IKAMAG R RH	IKA® Werke GmbH & Co. KG	IKA® -Werke GmbH & Co. KG, Janke & Kunkel-Str. 10 79219 Staufen Germany / Deutschland
Inkubations-/ Inaktivierungsbad	GFL®	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Schulze-Delitzsch-Str. 4 30938 Burgwedel, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf	siehe Eppendorf Reference
Kühlzentrifuge Megafuge 2.0 R	Heraeus	Heraeus Materials Technology GmbH & Co. KG, Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 100	Zeiss	Carl Zeiss NV-SA Ikaroslaan 49 1930 Zaventem, Belgien
Lichtmikroskopkamera: AxioCam ICc3	Zeiss	siehe Zeiss
Lichtmikroskop Labophot-2	Nikon Japan	Nikon GmbH Geschäftsbereich Mikroskope Tiefenbroicher Weg 25 40472 Düsseldorf
Mechanisches Schüttelgerät TH30	Edmund Bühler	Edmund Bühler GmbH Am Ettenbach 6 D-72379 Hechingen
Mikrowelle Miele De luxe M 686	Hartmann	Paul Hartmann AG 89522 Heidenheim, Germany
pH-Meter, pH 526	WTW GmbH	WTW Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Dr.-Karl-Slevogt- Straße 1, D-82362

		Weilheim Germany
--	--	---------------------

### 2.1.7 Computeranwendungen

AxioVision	Zeiss	siehe Zeiss
Graphpad Prism 5.0	Statcon	Statcon, Schulstr. 2, D-37213 Witzenhausen, Germany
Photoshop CS3	Adobe	Adobe Systems Deutschland GmbH 80992 München Deutschland
cell^P Soft Imaging System AnalySIS Image Processing Imagining Software for Life Science Microscopy	Olympus	siehe Olympus
C Olympus Soft Imaging Solutions	Olympus Olympus Europa GmbH Hamburg	siehe Olympus

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Aufarbeitung der Präparate

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde mit Spermien aus zwei unterschiedlichen Quellen gearbeitet: aus Ejakulaten der andrologischen Routinesprechstunde sowie aus Hodenbiopsien von Patienten mit obstruktiver Azoospermie.

#### 2.2.1.1 Ejakulat-Ausstriche

In der Regel stand 1 ml Ejakulat in einem 15 ml-Reaktionsgefäß zur Verfügung. Dieses wurde vor dem Ausstreichen gewaschen, indem es je nach Viskosität mit 2-3 ml PBS verdünnt und anschließend in einer Kühlzentrifuge von Heraeus (5 Min. bei 2000 Umdrehungen und 25° C) zentrifugiert wurde. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet zur Erreichung des ursprünglichen Ausgangsvolumens mit 1 ml PBS wieder aufgefüllt. Nachfolgend wurde es mit Hilfe einer Pipette resuspendiert.

Anschließend wurden 50 µl des gewaschenen Ejakulats auf den Objektträgern mit bzw. ohne Lysinbeschichtung nach WHO-Standards (WHO Manual 2010) ausgestrichen und in der Mikrowelle fixiert (s.w.u.). Falls eine herkömmliche chemische Fixierungsmethode angewendet werden musste, wurden die Ejakulate nach dem Ausstreichen im Brutschrank bei 37°C für ca. 5 Min. getrocknet (s. Abschnitt 2.2.2.1.).

Es wurde besonders darauf geachtet, dass der Ausstrich nicht zu dünnflüssig oder uneben erfolgte. Aufgrund der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten haben diese die Tendenz, sich zu Tropfen zusammenzuziehen. In solchen Fällen war die Verwendung und anschließende Auswertung der Ejakulate für die folgenden Tests erschwert.

#### 2.2.1.2 Ausstriche aus Gewebeproben

Wie im Abschnitt 2.1.1. beschrieben, befanden sich die Hodenbiopsien in einer Lösung aus Kollagenase (8mg) und SpermPrep (1ml) in 1,8 ml-Tubes. Das ursprüngliche Standard-Protokoll der Test-TESE mit einer Inkubationszeit von einer halben Stunde musste an dieser Stelle abgewandelt werden, da es zur Homogenisierung der Biopsien für eine möglichst weitgehende Extraktion der Spermien nicht ausreichte. Die Gewebeproben wurden im Folgenden für einen möglichst vollständigen Verdau zwei Stunden lang in der Kollagenase-Lösung bei 37°C inkubiert.

Andere Vorversuche zur Spermienextraktion aus Hodenbiopsien durch

- rein mechanisches Zerkleinern des Gewebes mit Hilfe von Pinzette / Schere / Messer oder durch Zermörsern mit Hilfe des Biozym-Pestells ohne Verwendung von Kollagenase,



- Einsatz unterschiedlicher Percoll-Gradienten (20% / 40% / 40% : 80%) nach der mechanischen Zerkleinerung,
- Pressen der Gewebeproben durch ein Zellsieb (Porengröße: 70 µm) nach einer nur halbstündigen Einwirkzeit der oben genannten Enzymlösung (hier noch keine Modifikation der Inkubationszeit),

brachten keinen sichtbaren Erfolg bezüglich der erhaltenen Spermienzahl und werden deshalb hier nicht näher beschrieben.

Lagen mehrere Hodenbiopsate eines Patienten vor, wurden diese in einem 15 ml-Tube zusammengeführt („gepoolt“), um die Anzahl der zu gewinnenden Spermien zu optimieren und um die unterschiedlichen Proben einander anzugleichen. Falls beim Überführen der Proben mit der Pipette diese noch nicht in kleinste Gewebsfragmente zerfielen, was nach zweistündiger Einwirkung der Kollagenase i. d. R. der Fall war, mussten diese Proben durch eine Drehbewegung des Biozym-Pestells in dem dafür vorgesehenen 1,5 ml-Tube weiter zerkleinert werden. Dann erfolgte die Anreicherung der Spermien mittels Zentrifugation in der Kühlzentrifuge für 5 Min. bei 2000 Umdrehungen und 4°C.

Es folgte ein Schritt der Aufkonzentrierung der Spermien: Der gesamte Überstand wurde bis auf die für Test-Ausstriche benötigten Volumina (pro Ausstrich 50µl Flüssigkeitsvolumen) vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das Pellet mit dem Rest an Flüssigkeit wurde mittels Pipette durchmischt und konnte anschließend ausgestrichen werden. Bei den Ausstrichen von diesem Material wurde dabei einem identischen Prozedere gefolgt wie bei Ejakulat-Ausstrichen (s. vorherigen Abschnitt). Ausnahme: Bei den Biopsie-Ausstrichen war somit kein PBS vorhanden.

### **2.2.2 Fixierungen**

In den Vorversuchen wurden viele unterschiedliche Methoden der Spermienfixierung und Spermienhaftung auf Objektträgern getestet, die eine möglichst gleichmäßige TUNEL- bzw. SCSA / AO-Anfärbung ermöglichen sollten. In den nachfolgenden Abschnitten werden aber nur die Methoden beschrieben, die in den weiteren Versuchen auch tatsächlich verwendet wurden.

#### **2.2.2.1 Paraformaldehyd 4% (PAF 4%) und modifizierte Carnoy-Fixierung**

Vor der Fixierung der Spermien-Ausstriche aus Ejakulaten und Gewebeproben erfolgte eine Lysinbeschichtung der Objektträger, sofern diese Beschichtung im Rahmen des Versuchs benötigt wurde. Für die Fixierung der Spermien wurde hauptsächlich Carnoy'sches Gemisch, modifiziertes Carnoy und PAF 4% eingesetzt. Die Herstellung der Carnoy-Mischung aus Methanol (Met) und Essigsäure (Ac) im Verhältnis 3:1 erfolgte jeweils frisch in einem 50 ml-Reaktionsgefäß.

Die 4%ige PAF-Lösung wurde aus Paraformaldehyd-Pulver hergestellt. Hierfür wurden 2 g Paraformaldehyd auf der Feinwaage abgewogen und mit 50 ml PBS in einem passenden Glasgefäß vermengt. Das Verrühren dieses Gemisches fand auf einem Heizrührer bei etwa 60°C statt, bis die Lösung klar wurde. Die Heizplatte sollte gerade noch mit der Hand zu berühren sein. Vor der Verwendung wurde die Lösung langsam abgekühlt. Gearbeitet wurde nach Vorschrift unter der Abzugshaube mit Handschuhen und Schutzbrille.

Für die modifizierte Carnoy-Fixierung wurden die Met/Ac-Mischung und die 4%ige PAF-Lösung in einem 50 ml-Reaktionsgefäß im Verhältnis 1:9 vermischt. Das fertige Fixativ wirkte für 30 Min. auf die ausgestrichenen Spermien im „medium reagent reservoir“ (12 Objektträger-Schlitze - pro Schlitz 4 ml des Fixativs) ein. Anschließend wurde für 5 Min. in PBS und danach für 1 Min. in bidest. H<sub>2</sub>O im „bioarray rack“ gewaschen. Alle Objektträger befanden sich dabei vollständig unter Flüssigkeit. Die Trocknung der Präparate erfolgte in der Kühlzentrifuge für 2 Min. bei 1200 Umdrehungen und 4°C.

#### **2.2.2.2 Erarbeitung einer modifizierten Fixierungsmethode mittels Mikrowelle**

Die Methode der Mikrowellenfixierung basiert auf dem Protokoll "FIXATION OF CELLS IN TISSUE CULTURE BY MICROWAVE IRRADIATION" (Patterson & Bulard, 1980). Zur Fixierung der Spermien wurde eine vereinfachte Vorgehensweise des vorliegenden Protokolls ausgearbeitet. Dazu wurden die Ausstrich-Präparate aus Ejakulaten oder Biopsien horizontal in die Mikrowelle gelegt und bei 600 Watt getrocknet. In der Testphase wurden Fixierzeiten von 10, 20, 30, 45 und-, 60 Sekunden an Ejakulat-Ausstrichen erprobt. Nach 15 Sekunden waren die Präparate in aller Regel sichtbar trocken und fixiert. Da sich diese Methode als zuverlässig erwies, wurde sie in den folgenden Abschnitten standardmäßig angewendet, falls nicht anders beschrieben. Zudem wurden die Ergebnisse aus der Mikrowellenfixierung als Referenzwert für die übrigen Fixative (PAF 4%) herangezogen.

#### **2.2.3 Verwendung von Objektträgern und Beschichtungen**

Ein Großteil der Vorarbeit für die anschließende Versuchsreihe mit den Färbemethoden TUNEL und SCSA / AO beinhaltete die Ausarbeitung der Konditionen der Spermien-Haftung auf Objektträgern, die zu einer möglichst optimalen und gleichmäßigen Anfärbung der Präparate durch beide Methoden beitragen sollten. Zudem wurden die im Labor vorhandenen Objektträger-Typen „SHANDON in-situ-Slides“, „MENZEL-Gläser“ und „SuperFrost Plus“ Objektträger in Bezug auf ihre Anhaftungs-Qualitäten mit einander verglichen. Dabei wurden zunächst vier verschiedene Variationen von jedem dieser Objektträger-Typen hergestellt:

1. Unbeschichtete Objektträger

2. Objektträger mit Lysinbeschichtung
3. Objektträger mit Fixativbeschichtung
4. Objektträger mit Lysin- und Fixativbeschichtung

Als Fixativ wurde modifiziertes Carnoy eingesetzt (10 % Met/Ac [3:1] zu 90% PAF[4%]). Alle Ausstriche auf den Objektträgern (n=12) stammten für eine bessere Vergleichbarkeit vom selben Ejakulat.

### **2.2.3.1 Beschichtung mit Poly-L-Lysin-Lösung**

Die Poly-L-Lysin-Lösung zur Beschichtung wurde im Verhältnis 1:10 mit bidest. H<sub>2</sub>O hergestellt. Die Objektträger wurden für 5 Min. bei Raumtemperatur in die frisch angesetzte Lösung eingetaucht. Danach erfolgte die Trocknung im Brutschrank für ca. 5 Min. bei 37°C. Insgesamt drei Zyklen dieser Prozedur wurden durchgeführt. Nach dem letzten Beschichtungsschritt folgte ein Waschgang in bidest. H<sub>2</sub>O für 5 Min. zur Erlangung schlierenfreier Objektträger. Anschließend folgte die Trocknung wie bereits beschrieben.

### **2.2.3.2 Auswertung: Vergleich der Objektträger und Beschichtungen**

Vor dem anschließenden Test-Waschgang wurden jeweils zwei Gesichtsfelder eines jeden Objektträgers mithilfe des Lichtmikroskops und der angebrachten Kamera fotografiert und die Bilder auf dem Computer gespeichert. Zur Wiedererkennung der Gesichtsfelder wurden diese auf der Rückseite des Objektträgers entweder mit permanenten Marker oder durch Anritzen markiert. Der Test-Waschgang erfolgte wie bereits oben beschrieben für 5 Min. in PBS-Bad und 1 Min. in bidest. H<sub>2</sub>O-Bad, anschließend wurden die Objektträger getrocknet. Danach wurden dieselben Gesichtsfelder ein weiteres Mal fotografiert und bezüglich der Anzahl der Spermien sowie möglicher Störfaktoren wie „Hintergrundfärbung“ mit dem ersten Bild verglichen. Die Vorher-/Nachher-Fotos wurden dazu mit dem Programm Photoshop CS3 einander gegenüber gestellt. Der Poly-L-Lysin-beschichtete MENZEL-Objektträger zeigte bezüglich der Spermienhaftbarkeit ohne chemisches Fixativ das beste Ergebnis und wurde für die nachfolgenden Versuche als Standard eingesetzt, falls nicht anders angegeben.

### **2.2.3.3 Verwendung der Hybridisierungskammer HybriWell**

Aufgrund von Unebenheiten der Präparate kann es zu einer ungleichmäßigen Anfärbbarkeit mittels TUNEL- oder SCSA / AO-Färbung kommen. Deshalb sollte der Objektträger so konstruiert werden, dass dieses Problem entfällt. Dies sollte durch die Verwendung von „HybriWell“-Kammern erreicht werden, wie sie für Hybridisierungen eingesetzt werden.

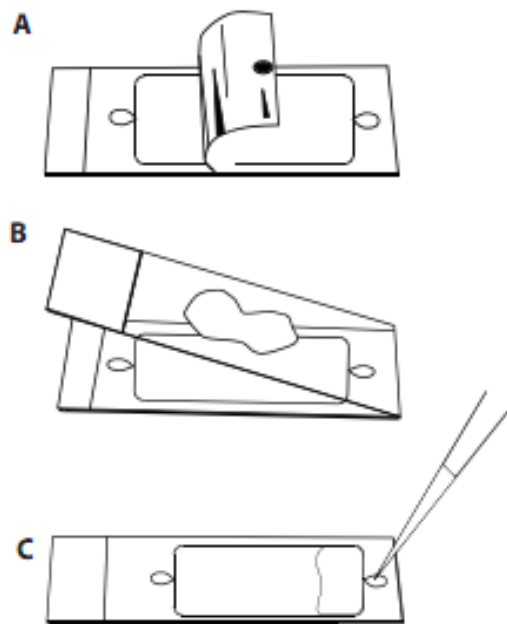


Abb. 2.1: Prinzip der Funktionsweise von HybriWell™ Hybridisierungskammern. A) Entfernung des Stickers von der Kammer B) Auflegen des Objektträgers auf die Hybridisierungskammer C) Einspritzen des Reagenz in die Kammer (MoBiTec Protokoll 2011).

Dafür wurden Turbo-DNase und TUNEL-Reagentien in die „HybriWell“-Kammern eingefüllt, welche auf den mit Spermien-Ausstrichen versehenen Objektträger angebracht wurden. Dabei wurden unterschiedliche Techniken ausgetestet, wie die ein- oder beidseitige Befüllung mit 50, 75 oder 100  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Reagenzien. Während der Einwirkzeit der Reagenzien der TUNEL-Reaktion für ca. 1 Std. befanden sich die Objektträger im mechanischen Schüttelgerät bei 200 U / Min. und 37°C. Für die nachfolgenden Waschschriffe und die Trocknung wurden die Kammern vom Objektträger abgezogen. Alle Einzelheiten zur TUNEL-Reaktion siehe unter Abschnitt 2.2.4.1.

#### 2.2.3.4 Modifikation des Objektträgers mit Tesafilm

Als Alternative zur „HybriWell“-Kammer wurde ein Objektträger konstruiert, an dessen zwei Enden zwei-fach Tesafilmstreifen von 1,5 cm Breite und 0,14 mm Dicke aufgeklebt wurden. Der Spermien-Ausstrich und der Permeabilisierungsschritt für die TUNEL-Reaktion erfolgten vor dem Aufkleben des Tesafilms. Die Tesafilmstreifen dienen der Stabilisierung des Flüssigkeitsfilms unter dem Deckgläschen, da die beobachtete ungleichmäßige Färbung möglicherweise auf eine variable Höhe des Films über der Probe zurückgeführt werden kann (vergleiche Abb. 2.2 und 2.3).

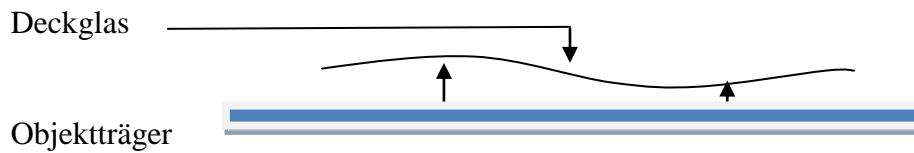


Abb. 2.2: schematische Darstellung eines Objektträgers mit Deckgläschen über dem ungleichmäßigen Reagenzfilm (Seitenansicht).

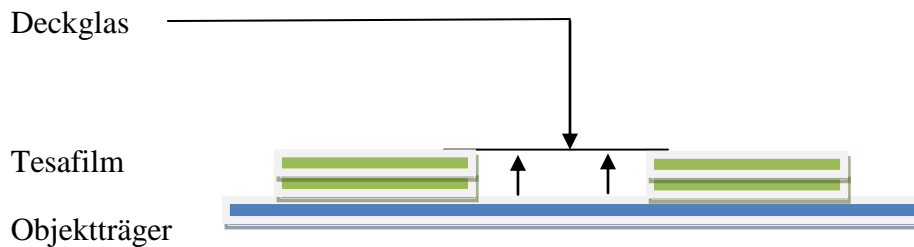


Abb. 2.3: schematische Darstellung vom Objektträger mit Tesafilm (Seitenansicht).

Der Abstand zwischen den beiden Tesafilmstreifen wurde auf 1,5 cm festgelegt. Auf die freiliegende Objektträgerfläche von 1,5 cm × 2,6 cm (Abstand der Tesafilmstreifen × Breite des Objektträgers) wurden 50 µl TUNEL-Reagenz gegeben und das Präparat anschließend mit Deckgläschen (Menzel-GLÄSER 21×26 mm) bedeckt.

### 2.2.3.5 Einfluss der Höhe der Flüssigkeitssäule

Um herauszufinden, wie sich eine unterschiedlich hohe Flüssigkeitssäule auf das Ergebnis der TUNEL-Reaktion auswirkt, wurde ein Flüssigkeitssäulen-Gradient nach dem Modell der Objektträger mit Tesafilmstreifen gebaut (Abb. 2.4). Dazu wurden auf der linken Seite des Objektträgers (Frontansicht) zwei HybriSlip™ Coverslips aus Plastik von annähernd der Höhe des Tesafilms übereinander gelegt. Rechts davon wurden 50 µl TUNEL-Reagenz hinzugefügt, die mit einem Deckgläschen (MENZEL-GLÄSER 24×40 mm) bedeckt wurden, das links auf dem doppelten Plastiksteg auflag. Dabei wurde eine von links nach rechts abnehmende Flüssigkeitssäule über dem Präparat errichtet.

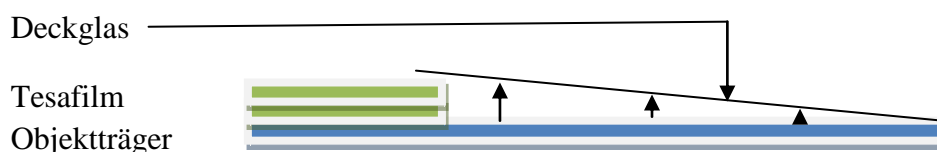


Abb. 2.4: Aufbau des Flüssigkeitsgradienten unter dem Deckgläschen, vertikale Pfeile stellen die unterschiedlichen Reagenzhöhen dar (Seitenansicht). Der linke, mittlere und rechte senkrechte Pfeil entsprechen der höchsten, zweithöchsten und niedrigsten Reagenzhöhe.

Zur Gewährleistung einer möglichst hohen Fluoreszenz wurden in dieser Versuchsreihe alle Präparate vor der TUNEL-Reaktion mit Turbo-DNase vorbehandelt.

Die Auswertung erfolgte mittels fotografischer Aufnahmen bei 10-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop. Die Objektträger wurden dazu in drei Abschnitte mit unterschiedlich hoher Flüssigkeits-Säule aufgeteilt. Pro Abschnitt wurden je drei Fotos hergestellt. Insgesamt wurden also für jedes Präparat neun GF mit durchschnittlich 2000 Spermien fotografiert. Von jedem GF wurde ein Foto im Hellfeld mit der Belichtungszeit von 50 ms, und ein Fluoreszenzbild bei einer Belichtungszeit von 2000 ms gemacht. Für die Fluoreszenzbilder wurde ein Laser mit 490 nm Wellenlänge (FITC = 488nm / 525nm) verwendet. Anschließend wurden die Bilder ausgedruckt und die Spermien bzw. die dazugehörigen Fluoreszenzsignale manuell ausgezählt und verglichen.

## 2.2.4 Färbungs-Reaktionen

### 2.2.4.1 TUNEL

Für die TUNEL-Reaktion (Abb. 2.5) wurden die aus Ejakulaten bzw. Gewebeproben gewonnenen Spermien auf lysinbeschichteten Menzel-Gläsern ausgestrichen und mittels Mikrowelle fixiert (s. 2.2.2.2.). Vor der TUNEL-Reaktion war ein Permeabilisationsschritt erforderlich, der die Membran der Spermien durchgängig machen sollte. Gearbeitet wurde hier mit der Permeabilisations-Lösung 2 (nähere Erläuterung folgt unten im Abschnitt 2.2.5.). Dazu wurden die Objektträger für 15 Min. bei Raumtemperatur in die Lösung eingetaucht (ca. 15 ml pro Schlitz des medium reagent reservoirs). Gewaschen wurde mit PBS für 5 Min. und mit H<sub>2</sub>O bidest. für 1 Min.. Anschließend wurde in der Kühlzentrifuge für 2 Min. bei 1200 Umdrehungen und 4°C getrocknet.

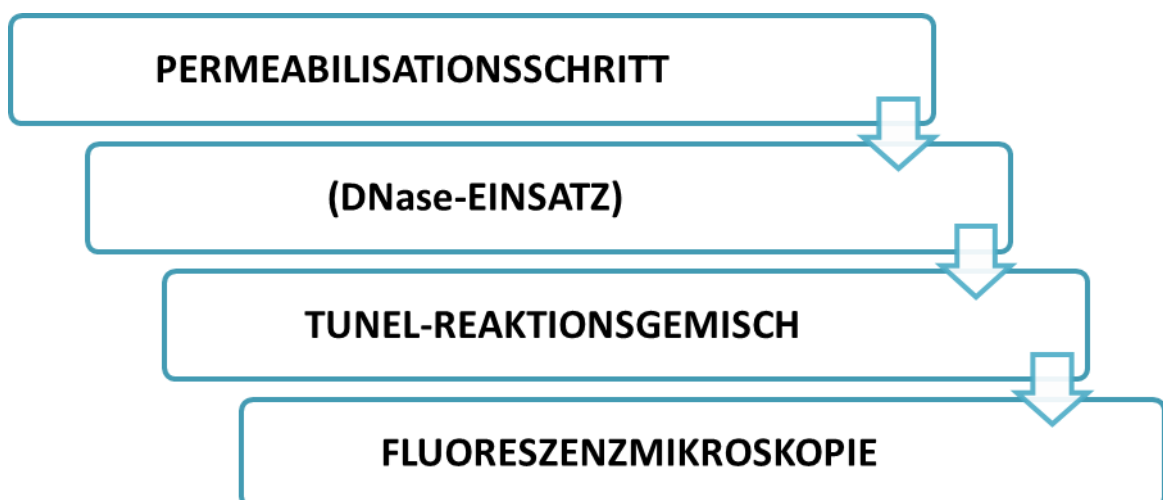


Abb. 2.5: Flowchart zum Ablauf der TUNEL-Reaktion.

In den Standard-Versuchen wurde pro Patient ein Präparat ohne DNase-Einsatz einem Präparat mit Turbo-DNase-Einsatz gegenübergestellt:

Die Turbo-DNase und der dazugehörige Puffer wurden während des Permeabilisationsschrittes bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Fertiglösung für einen Objektträger bestand aus 2 µl Turbo-DNase + 50 µl Turbo-DNase-Puffer = 52 µl. Diese wurde auf das Präparat gegeben, das anschließend für 1 Std. im Inkubationsbad bei 37°C gelagert wurde. Waschung und Trocknung erfolgten wie bereits beschrieben.

Im Voraus wurde die TUNEL-Reaktionsmischung aus „Label Solution“ und „Enzyme Solution“ nach Vorschrift des Herstellers hergestellt. Es wurden parallel jeweils 50 µl Reaktionsmischung auf zwei Präparate gegeben: einmal auf ein mit Turbo-DNase vorbehandeltes Präparat als Positivkontrolle und einmal auf ein natives Test-Präparat zur Darstellung der nativen DNA-Fragmentation in den Spermien. Diese wurden anschließend wieder für 1 Std. im Inkubationsbad bei 37°C gelagert. Waschung und Trocknung erfolgten wie bereits beschrieben.

Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie in einem abgedunkelten Raum. Für die Hellfeldaufnahmen wurde eine Belichtungszeit von 50 ms ausgewählt. Für die Fluoreszenzbilder wurde ein Laser bei 490 nm Wellenlänge mit dem FITC-Filter mit einer Belichtungszeit von 2000 ms verwendet. Die Aufnahmen erfolgten bei 10-facher Vergrößerung. Von jedem Präparat wurden mindestens vier Gesichtsfelder fotografiert, abhängig von der Spermienzahl. Hellfeld- und Fluoreszenzbilder desselben Gesichtsfeldes wurden nacheinander mithilfe einer Digitalkamera aufgenommen und manuell anhand ausgedruckter Bilder ausgewertet. Pro Patient wurden durchschnittlich 2000 Spermien ausgezählt.

#### 2.2.4.2 SCSA mittels AO-Färbung

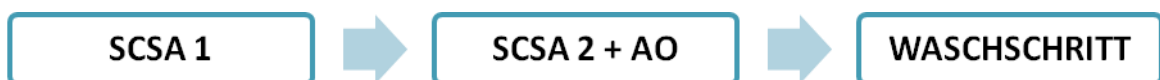


Abb. 2.6: Schema des Ablaufs der AO-Färbung.

Für die SCSA / AO-Färbung wurden die Objektträger für 30 Sek. in die Detergenz-Lösung (SCSA 1) aus 0,1% Triton X-100, 0.15 M NaCl und 0.08 M HCl mit pH 1.2 eingetaucht. Anschließend erfolgte ein sofortiges Überführen in AO-Farblösung in Phosphat-Zitrat Puffer (SCSA 2) mit der Konzentration 6 mg/L und pH 6.0 (Mischung aus 2,4 µl AO in 4 ml SCSA 2) für 2 Min. (Lin *et al.*, 2008). Die Waschung erfolgte jeweils für 2 Min. in PBS-Bad und H<sub>2</sub>O bidest.. Getrocknet wurde standardmäßig in der Kühlzentrifuge. Alle Schritte fanden bei Raumtemperatur in einem abgedunkelten Raum statt.

Für einen möglichst genauen Vergleich von TUNEL und SCSA / AO sollten beide Tests idealerweise auf einem Spermium zur Deckung gebracht werden. Die zur Auswertung des

SCSA-Tests übliche Methode der Flowzytometrie bietet diese Möglichkeit nicht und stand hier auch nicht zur Verfügung. Hier wurde stattdessen durch eine AO-Überfärbung der Präparate aus dem TUNEL-Test (ohne / mit DNase-Einsatz) ein direkter Vergleich beider Methoden versucht. Für den direkten Vergleich wurde beim TUNEL-Test noch teils mit Poly-L-lysin-beschichteten SuperFrost Plus Objektträgern + modifizierter Carnoy-Fixierung (s. 2.2.2.1.) und teils mit lysinbeschichteten Menzel-Objektträgern + Mikrowellenfixierung gearbeitet, weil diese Versuche parallel zu anderen Tests durchgeführt wurden.

Ein weiterer Ansatz mit SCSA-/AO-Färbung fand separat von den TUNEL-Präparaten in 15 ml-Tubes statt. Zum Vergleich zwischen der SCSA / AO-Färbung mit und ohne DNase-Einsatz wurde das Ejakulat in den 15 ml-Reagenzröhrchen für 15 Min. mit der Permeabilisationslösung 2 (50 µl pro 50 µl Ejakulat) vorbehandelt. Gegen Ende der Einwirkungszeit wurden die Ejakulate in der Kühlzentrifuge für 5 Min. bei 1200 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand beider Röhrchen verworfen. Nun wurde eines der beiden Tubes mit Turbo-DNase (50 µl pro 50 µl Ejakulat) versetzt und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde es erneut zentrifugiert und dessen Überstand verworfen (wie zuvor beschrieben). Nachfolgend wurde die SCSA-/AO-Färbung in den beiden Röhrchen parallel durchgeführt. Zu je 50 µl Ejakulat wurde sequenziell 200 µl SCSA 1 für 30 Sek. und die vorgefertigte Lösung aus AO + SCSA 2 (in der Menge 0,36 µl + 0,6 ml) hinzugefügt, welches sofort in der Kühlzentrifuge für 5 Min. bei 1200 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgekippt und 50 µl PBS dazugegeben. Dieses wurde resuspendiert und auf Objektträgern ohne Fixativ, da hier nicht benötigt, ausgestrichen. Die Trocknung erfolgte wie beschrieben in der Kühlzentrifuge.

2 x 15ml Reaktionsgefäß ohne DNase	2 x 15ml Reaktionsgefäß mit DNase
- Zentrifugieren wie bereits beschrieben	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vorbehandlung mit Permeabilisationslösung 2 für 15 Min.</li> <li>-Zentrifugieren [1200 G, 5 Min., 4°C]</li> <li>- Verwerfen des Überstandes</li> <li>- Zugabe von 50 µl DNase für 1 Std.</li> <li>- Zentrifugieren wie oben beschrieben</li> </ul>



- 200 µl SCSA 1 für 30 Sek. (gut mit Pipette durchmischen)
- 0,6 ml SCSA 2 mit 0,36 µl AO hinzufügen
- Sofortiges Zentrifugieren [1200 G, 5 Min., 4°C]
- Verwerfen des Überstandes
- Zugabe von je 50 µl PBS zu jedem Tube, gut durchmischen
- Ausstreichen von je 50 µl Reagenz
- Trocknen lassen im Dunkeln
- Fluoreszenzmikroskopieren

Abb. 2.7: Schematischer Ablauf der SCSA- / AO-Färbung.

Die Auswertung erfolgt wie beim TUNEL-Test. Allerdings wurde ein Laser mit einem Filter (TRITC) der 540-570 nm Wellenlänge verwendet. Dabei wurde Licht der Wellenlänge 530 nm (grün = doppelsträngige DNA) und 640 nm (rot = einzelsträngige DNA) emittiert; die Belichtungszeit betrug wieder 200 ms.

### **2.2.5 Modifikationen der TUNEL-Reaktion**

Die Verwendung der DNase aus dem In Situ Cell Death Detection-Kit und dem Fluorescein der Firma Roche führte zu stark inhomogenen und teilweise nicht-reproduzierbaren Positivkontrollen. Die DNase wurde dementsprechend ausgetauscht gegen die Turbo-DNase von Firma Ambion, die in doppelter Konzentration (2 µl auf 50 µl Puffer) verwendet wurde.

#### **2.2.5.1 Permeabilisationslösungen 1 vs. 2**

Um den Einfluss des Säuregehaltes auf die DNA-Fragmentation zu untersuchen, wurden zwei Permeabilisationslösungen mit unterschiedlichen pH-Werten getestet. Permeabilisationslösung 1 bestand aus 0,1 % Na-Zitrat und 0,1 % Triton X-100, pH 7,6.

Die modifizierte Permeabilisationslösung 2 bestand aus 0,1 % Zitronensäure und 0,1 % Triton X-100, pH 2,4. Beide wurden auf ausgestrichenen Ejakulaten desselben Patienten mit daran anschließender TUNEL-Reaktion ohne und mit DNase-Einsatz angewendet. Es wurden also pro Patient mindestens 4 Ausstriche je 50 µl benötigt.

Für Inkubationszeiten der einzelnen Lösungen und Ablauf mit anschließender Auswertung siehe Abschnitt 2.2.4.1.

Um weiterhin zu prüfen, in welchem Ausmaß die Höhe der DNA-Fragmentation vom Säuregehalt der Permeabilisationslösung abhängt, wurden von der Permeabilisationslösung 2 Konzentrationen mit 0,02%, 0,1% und 0,2% Zitronensäure in 0,1% Triton X-100 erstellt. Die TUNEL-Reaktion wurde an jeweils zwei Ausstrichen pro Konzentration (alle mit DNase-Einsatz) durchgeführt. Alle Ausstriche stammten vom selben Ejakulat (zum genauen Ablauf zum TUNEL-Test siehe Abschnitt 2.2.4.1 und 2.2.5).

### 2.2.6 PICSI-Schale

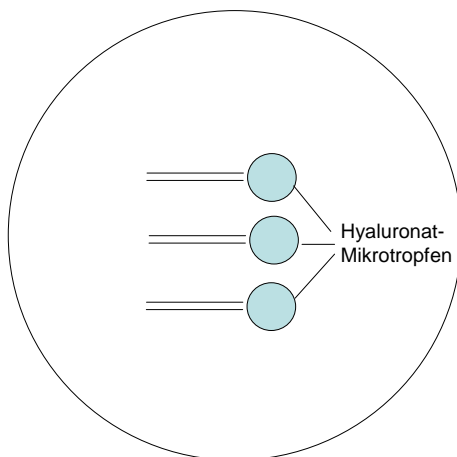


Abb. 2.8: Schematischer Aufbau der PICSI-Schale. Die Schale besitzt drei Hyaluronsäure-Mikrotropfen am Ende einer Linienmarkierung in der Schalenmitte, an der die Spermien aufgebracht werden.

Es wurden unterschiedliche Modifikationen des Protokolls der „Origio MIDATLANTIC DEVICES PICSI Spermienauswahl Gebrauchsanweisung“ getestet: Bindungszeiten von 30 und 5 Min, Bindung von gewaschenen und ungewaschenen Spermien sowie Verwendung von 100.000, 50.000 und 10.000 Spermien / 20 µl Volumen pro HA-Spot.

Daraus resultierte die folgende optimierte Vorgehensweise. 20 µl unbehandeltes Ejakulat pro Spot wurden für 5 Min. im Wasserbad bei 37°C an die Hyaluronat (HA)-Mikrotropfen gebunden. Das Wasserbad diente der Verhinderung der Austrocknung. Es war keine weitere Fixierung auf den PICSI-Schalen erforderlich. Die Ablösung erfolgte durch sanftes Eintauchen der PICSI-Schale ins PBS-Bad und anschließend ins bidest. H<sub>2</sub>O-Bad. Getrocknet wurden diese im Brutschrank bei Umluft bei 37°C. Jeder Schritt wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

Der Versuch, die HA-gebundenen Spermien mittels PAF 4% für die nachfolgenden Schritte sicher zu fixieren, brachte keinen Vorteil, sondern bewirkte ein vermehrtes Abwaschen und ein erhöhtes „Hintergrundrauschen“ durch Kristallbildung.

Vor der TUNEL-Reaktion erfolgte die Permeabilisierung der HA-gebundenen Spermien in der PICSI-Schale durch Zugabe von 20 µl Permeabilisations-Lösung 2 pro HA-Spot; Inkubation für 15 Min. bei 37°C. Waschung und Trocknung erfolgten wie oben. Danach wurden für die Positiv-Kontrolle die Spermien in einem von drei HA-Spots mit 20 µl Turbo-DNase inkubiert (1 Std. im Inkubationsbad bei 37°C). Damit die DNase-Lösung nicht auf die benachbarten Spots übergriff und den Vergleich zwischen Kontrolle und nativen Spermien verfälschte, wurde dieser Spot mithilfe eines Klebestifts abgetrennt. Anschließend erfolgten Waschung und Trocknung wie bereits beschrieben.

Die DNA-Fragmentationsraten der Spermien aus den PICSI-Schalen sollten anschließend mit denen der direkt auf Objektträgern ausgestrichenen Spermien verglichen werden. Parallel zum Reaktionsablauf auf der PICSI-Schale wurden dazu je 50 µl desselben Ejakulats auf zwei Poly-L-Lysinbeschichteten Menzel-Objektträgern ausgestrichen. Diese wurden einmalig dem TUNEL-Test mit und ohne DNase-Einsatz unterzogen.

Die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie im Abschnitt 2.2.4.1. beschrieben. Jeder HA-Spot wurde bei 10-facher Vergrößerung fotografiert und die gebundenen Spermien ausgezählt. Dabei war eine flache und stabile Unterlage essentiell, die hier aus dem durchsichtigen Plastikdeckel einer CD-Hülle bestand.

Zusätzlich wurden Versuche unternommen, selbst HA-Spots aus Hyaluronat-Mikrotropfen herzustellen. Dazu wurde Hyaluronsäure aus dem Hahnenkamm in verschiedenen Verdünnungen getestet. Von jeder Verdünnung wurde ein 1 µl-Tropfen auf unterschiedliche Trägermaterialien aufgebracht. Als mögliche Träger wurden Poly-L-lysinbeschichtete Menzel- und „SuperFrost Plus“-Objektträger, kleine und große Plastik-Petrischalen, PICSI-Schalen mit hydrophober und Fibronectin-Beschichtung aus Plastik sowie Fluoreszenz-fähige „FluoroDishes“ aus Glas getestet. Mit letztgenannten wurde zugleich die Fluoreszenzdurchlässigkeit von Standard-PICSI-Schalen überprüft. Diese war bei PICSI-Schalen vergleichbar mit den speziellen „FluoroDishes“.

Die HA-Tropfen wurden für mindestens 45 Min. bei 60°C Umluft getrocknet oder in der Mikrowelle bei 600 Watt fixiert. Zusätzlich wurde ein Gemisch aus Hyaluronsäure und Poly-L-Lysin nach den oben angegebenen Verdünnungen im Verhältnis 1:1 erstellt und ausgetestet. Die anschließenden lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigten jedoch, dass der Versuch, die Hyaluronsäure-Spots selbst herzustellen, erfolglos war.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vergleich von TUNEL-Test und SCSA/AO-Test

Erwartungsgemäß wies der TUNEL-Test in der DNA von ausgestrichenen Spermien vorhandene Doppelstrangbrüche nach, kenntlich durch eine Grün-Fluoreszenz der Spermienköpfe (Abb. 3.1). Die hier gezeigte DNase-behandelte Kontrolle spricht für ein deutlich positives Ergebnis. Ein Vergleich mit dem Hellfeld-Bild des Ausstrichs zeigt aber, dass keineswegs in allen Spermienköpfen Doppelstrangbrüche erkennbar sind, wie nach einer vollständigen DNase-Verdauung zu erwarten gewesen wäre. Die mangelnde Empfindlichkeit bestätigte sich in weiteren Experimenten und zeigt bereits die Problematik, dass nicht alle Spermienköpfe für das Enzym und / oder das TUNEL-Reagens gleich zugänglich sind.

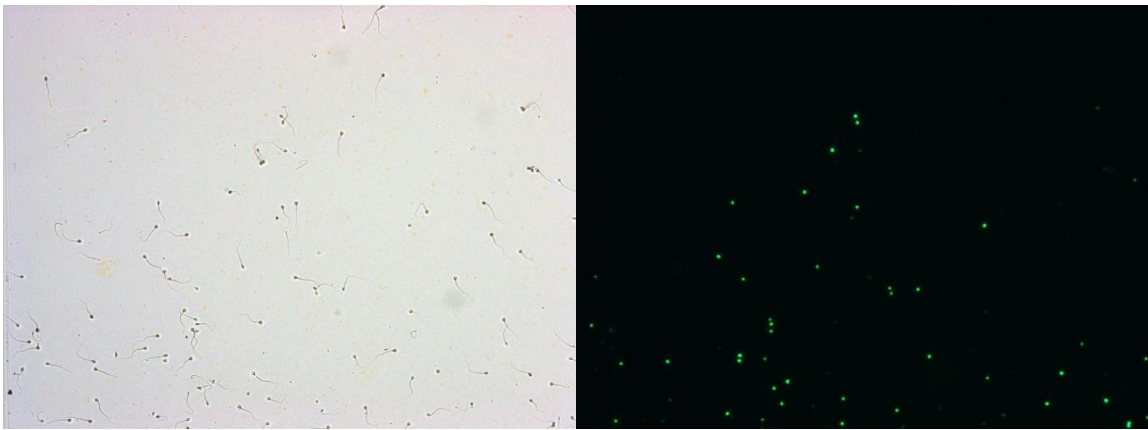


Abb. 3.1: Fluoreszenzbild einer TUNEL-Positiv-Kontrolle, d.h. Reaktion nach DNase-Einsatz (links: Hellfeld 50 ms; rechts: FITC 2000 ms) bei 10-facher Vergrößerung.

Das Ergebnis der anschließenden Acridin Orange (AO)-Färbung von Spermien-Ausstrichen *in situ* (Abb. 3.2-3.5) entsprach nicht den Erwartungen. Normale Spermien sollten ein grünes, Spermien mit denaturierter oder einsträngiger DNA ein gelbes oder rotes Signal ergeben. Tatsächlich fluoreszierten aber die meisten Spermienköpfe in beiden Kanälen (Abb. 3.2), Folge einer mangelnden Justierung der Farbschwellwerte.

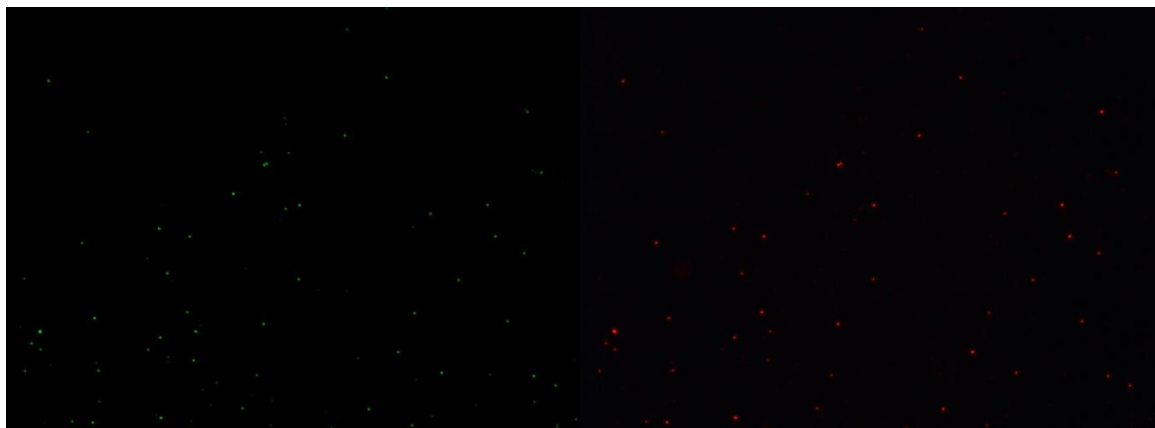
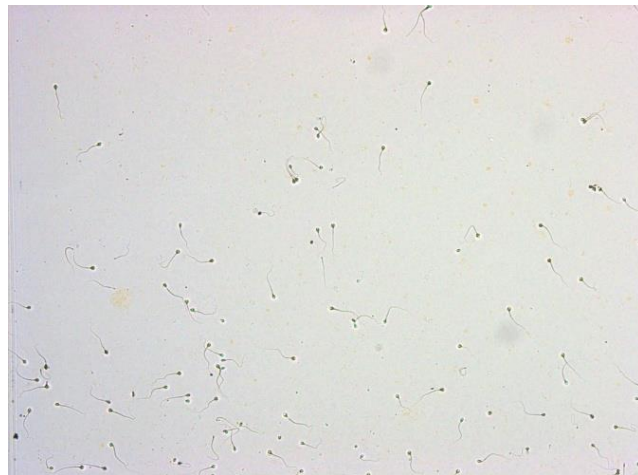


Abb. 3.2: AO-gefärbtes Präparats im Hellfeld (oben: BF 50 ms), in der Grün-Fluoreszenz (links: FITC 200 ms) sowie in der Rot-Fluoreszenz (rechts: TRITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung.

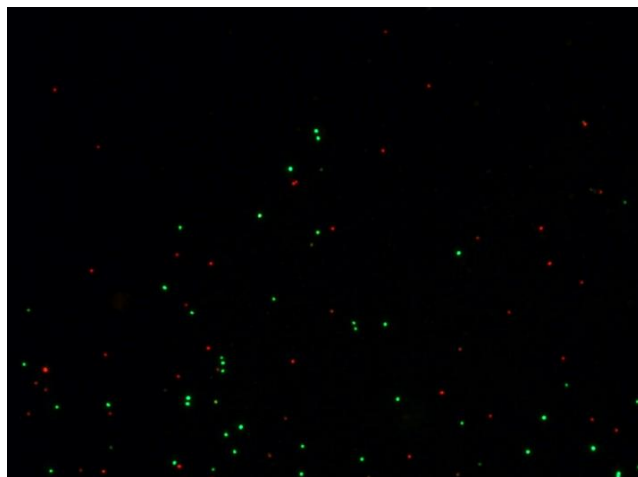


Abb. 3.3: Überlappendes Fluoreszenzbild eines TUNEL- plus AO-gefärbten Präparats (grün: TUNEL mit FITC 2000 ms; rot: AO mit TRITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung.

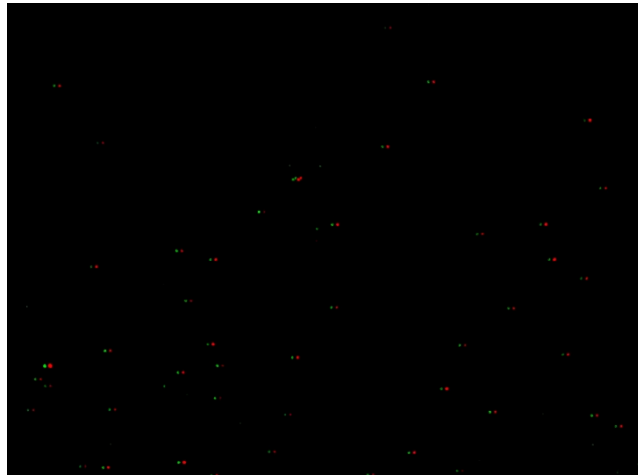


Abb. 3.4: Fluoreszenzbild eines AO-gefärbten Präparats in zwei Kanälen (grün: FITC 200 ms; rot: TRITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung.

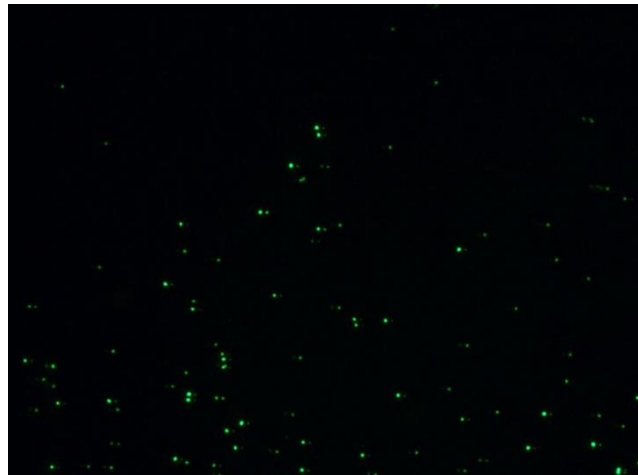


Abb. 3.5: Versetztes Fluoreszenzbild von TUNEL- plus AO-gefärbtem Präparat (TUNEL FITC 2000 ms gegen AO FITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung.

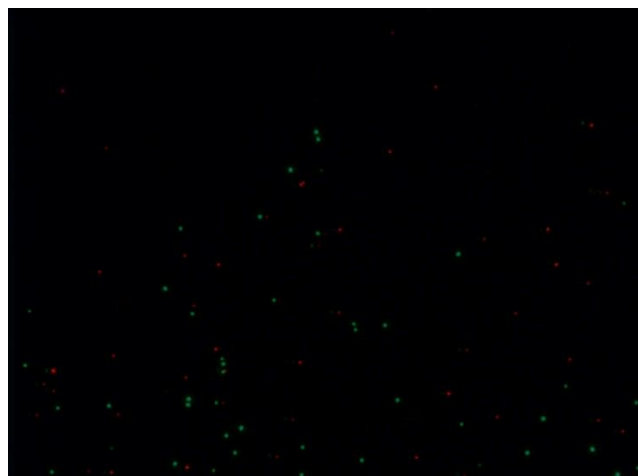


Abb. 3.6: Versetztes Fluoreszenzbild von TUNEL- und AO-gefärbtem Präparat (TUNEL FITC 2000 ms gegen AO TRITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung.

Laut Literatur sollten TUNEL- und SCSA/AO-Test vergleichbare Daten zur DNA-Fragmentation in Spermien liefern (Chohan *et al.*, 2006). Es wurden beide Methoden auf demselben Objektträger durchgeführt, um direkt festzustellen, wie hoch die Übereinstimmung zwischen beiden Methoden ist. Im hier gewählten Versuchsansatz sollten im SCSA/AO-Test diejenigen Spermien rot leuchten (d.h. DNA fragmentiert), die bereits auch im TUNEL-Test positiv waren, hier also grün fluoreszierten. Umgekehrt sollten im SCSA/AO-Test alle Spermien grün leuchten (d.h. DNA unfragmentiert), die im TUNEL-Test negativ waren.

Leider traf diese Erwartung nicht zu. Stattdessen zeigte sich folgendes Ergebnis: Spermien, die nach TUNEL stark grün leuchteten, zeigten sich nach SCSA/AO als schwach grün und umgekehrt (Abb. 3.5). Dagegen zeigten die SCSA/AO-gefärbten Präparate im roten Kanal ein entgegengesetztes Verhalten: Spermien, die im TUNEL stark grün fluoreszierten, waren in SCSA/AO-Test kaum rot und umgekehrt (Abb. 3.6). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass sich beide Methoden nicht nacheinander auf demselben Objektträger anwenden lassen und ein direkter Vergleich auf einem Spermien-Ausstrich so nicht möglich ist.

Bei der Durchführung von TUNEL- und SCSA/AO-Test auf separaten Objektträgern beobachtete man auf den beiden Objektträgern zwar die richtigen Farbverschiebungen, eine genaue Auswertung war aufgrund von PBS-Kristallen aus dem Waschschrift vor Reaktionsbeginn oder Kristallen anderen Ursprungs aber erschwert. Kristalle zeigten sich auch dann, wenn das Ejakulat vorher nicht einem PBS-Waschgang unterzogen worden war. Die Mehrzahl der Spermien sammelte sich in diesen Kristallen an, sodass eine Auszählung aufgrund erschwerter Sicht kaum möglich war.

### **3.2 AxioVision – Computerprogramm zur Quantifizierung von Zellen**

Um Spermien quantifizieren zu können, wurde das Programm „AxioVision“ getestet, das Bildaufnahme und Bildverarbeitung mit der Bildanalyse kombiniert. Die Anwendung auf Spermienausstrichen erwies sich jedoch als problematisch. Unterschiedliche Belichtungszeiten, Schärfegrade der erstellten Bilder, Schmutzpartikel und Kristallbildung, Hintergrund-Unterschiede von Ejakulat zu Ejakulat sowie in den Spermienköpfen vorhandene Vakuolen erschwerten einen unmittelbaren Vergleich, sodass die Einstellungen in „AxioVision“ hätten laufend an wechselnde Bildqualitäten angepasst werden müssen. Ähnliches galt für ständig wechselnde Farbschwellwerte in der Fluoreszenz. Wegen des hohen Arbeits- und Zeitaufwandes zur kontinuierlichen Neueinstellung des Programms und Nachbearbeitung der Bilder für die Spermienzählung wurde diese Methode nicht weiter berücksichtigt.

### 3.3 Optimierung der Methoden

Nachdem die Problematik des Methodenvergleichs deutlich geworden war, widmeten sich die nachfolgenden Versuche der Optimierung der TUNEL-Reaktion. Anfängliche Versuche mit unterschiedlichen Fixativen auf Objektträgern mit und ohne Beschichtung, Vergleich von DNase I und Turbo-DNase, Spermien-Haftung auf SuperFrost R° Plus-Objektträgern führten bisweilen zu unterschiedlichen Ergebnissen der TUNEL-Färbung, auch bei denselben Patienten. Viele Ursachen dieser mangelnden Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit waren bislang unbekannt. Als wahrscheinlichste Ursache nahmen wir eine Interaktion zwischen Bestandteilen des jeweils verwendeten Fixativs und der Oberfläche des Objektträgers sowie dem Ejakulat an.

Mit Hilfe der Mikrowellenfixierung sollten mögliche Einflüsse von Fixativen ausgeschlossen werden. Viele Ingredienzien der oben genannten Fixative haben eventuell einen Einfluss auf die Struktur der DNA, mit der Folge einer veränderten TUNEL-Reaktion. Beispiele dafür wären hydrolytische bzw. denaturierende Effekte der Säuren aus der Bouin'schen Lösung bzw. der modified Davidson's Fluid (mDF). Paraformaldehyd verursacht dagegen Quervernetzungen zwischen DNA und Proteinen. Leider war der Einfluss dieser Faktoren auf die TUNEL-Reaktion aufgrund der starken Inhomogenität zwischen den Ergebnissen nicht quantitativ erfassbar. Einen sicheren Ausschluss eines chemischen Einflusses des Fixativs verspricht am ehesten die Methode der Mikrowellenfixierung (Ko *et al.*, 2001; Patterson & Bulard, 1980).

Ein weiterer Unterschied zwischen der Mikrowellenfixierung und den chemischen Fixativen ist, dass nach den Waschgängen gelegentlich PBS- evtl. anderweitige Kristalle auf dem Objektträger verblieben. Diese behinderten nicht nur die Sicht auf die Spermien, sondern könnten Auswirkungen sowohl auf die TUNEL-Reaktion selbst als auch die Homogenität des Tests auf dem Objektträger haben.

Dass die DNA-Fragmentationsrate in den Positivkontrollen nie vollständig war (vergleiche Abb. 3.1), sondern auch nach Einsatz der Turbo-DNase nur zwischen 50-80% lag, war unerwartet. Nach dem Beheben der Inhomogenität der Ausstrichpräparate gingen wir der Frage nach, wie sich die Empfindlichkeit steigern und ob sich eine vollständige DNA-Fragmentation in der Positiv-Kontrolle überhaupt erreichen lässt.

Zunächst wurden unterschiedlichste Objektträgertypen auf ihre Fähigkeit zur Spermienhaftung untersucht. Es ist möglich, dass die verschiedenen Oberflächen der Objektträger die Spermien eventuell sogar abstoßen und somit für eine schlechtere Haftung verantwortlich sein könnten. Weiterhin wurden Beschichtungen und Fixative getestet. Die Gegenüberstellung von

- Objektträgern mit Poly-L-Lysinbeschichtung
- Objektträgern mit Poly-L-Lysinbeschichtung mit modifiziertem Carnoy (Met/Ac (3:1) 10% zu PAF 4% 90%)



- unbeschichteten Objektträgern
- Objektträgern mit modifiziertem Carnoy

ergab, dass Menzel-Objektträger mit Poly-L-Lysinbeschichtung ohne zusätzliches Fixativ am besten zur Spermienhaftung geeignet waren. Diese wurden (wenn nicht anders angegeben) in den darauffolgenden Versuchen eingesetzt.

### 3.3.1 Einfluss der Dauer der Mikrowellenfixierung auf die Spermienhaftung

Abbildung 3.7 zeigt, dass (i) die Dauer keinen Einfluss auf die Spermienhaftung hatte, und dass (ii) die Mikrowellenfixierung sich als Fixierungsmethode gut eignet, da nach simuliertem Waschgang bei allen getesteten Fixierungszeiten mehr als 90% der Spermien auf den Objektträgern haften verblieben. Der Vergleich wurde mithilfe von Vorher-/Nachher-Fotos derselben Gesichtsfelder durchgeführt. Pro Patient wurden dazu ca. 200 Spermien ausgezählt.

**Zeiteffekt der Mikrowellenfixierung auf Ablösung der Spermien**

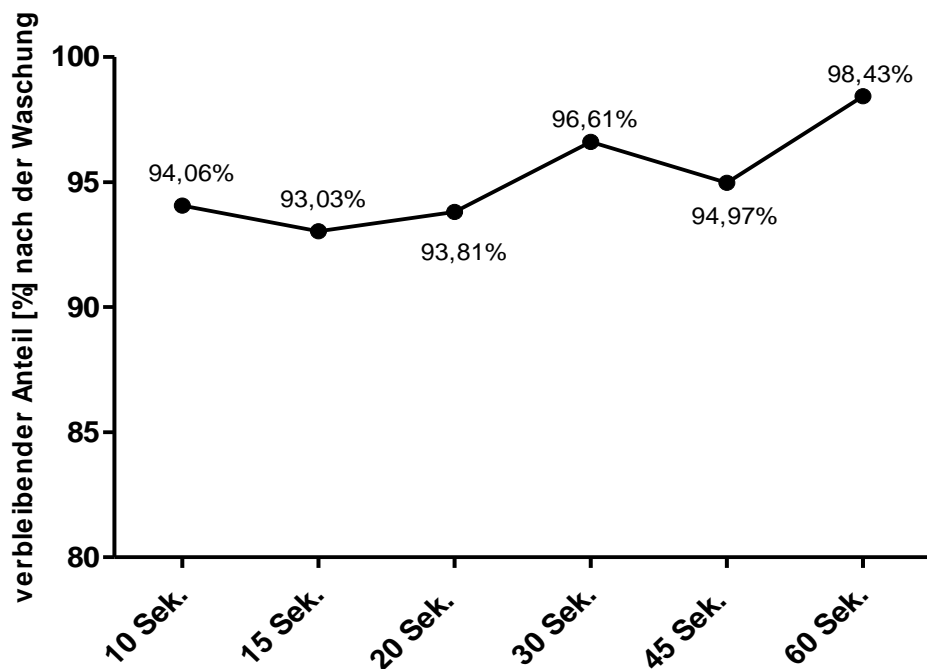


Abb. 3.7: Spermienhaftung in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer (in Sek.) in Mikrowelle bei 600 Watt (10 Sek:  $n=2$ ; 15 Sek:  $n=11$ ; 20 Sek:  $n=2$ ; 30 Sek:  $n=3$ ; 45 Sek:  $n=2$ ; 60 Sek:  $n=3$ ) nach Simulationswaschgang.

Der Kurvenverlauf deutet zwar an, dass es nach längeren Fixierungszeiten in der Mikrowelle zu einer leichten Steigerung der Spermienhaftung kommt, diese war aber nicht

signifikant. Im Folgenden wurden möglichst geringe Fixierungszeiten verwendet, um Auswirkungen auf die DNA gering zu halten. Auf diesen Zusammenhang wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

### 3.3.2 Einfluss der Dauer der Mikrowellenfixierung auf die DNA-Fragmentationsrate

Für diese Untersuchung wurde der Einfluss von zwei unterschiedlichen Zeitspannen, hier 15 und 45 Sekunden Mikrowellenfixierung, auf Spermien-Ausstrichen zweier Patienten verglichen.

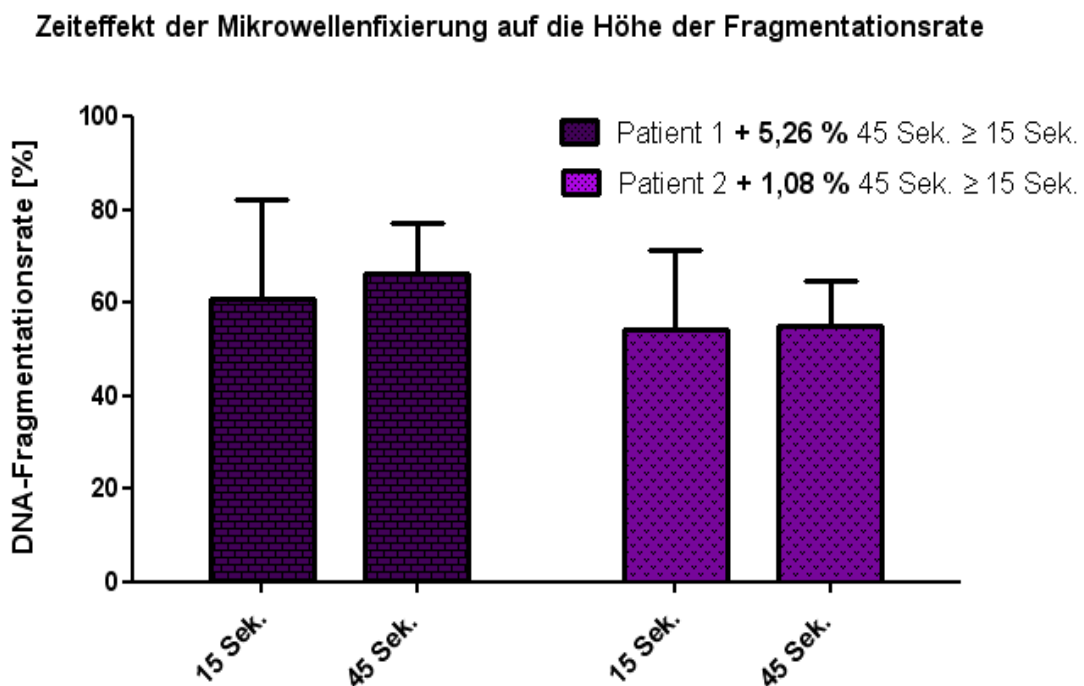


Abb. 3.8: Vergleich von DNA-Fragmentationsraten bei 15 Sek. und 45 Sek. Mikrowellen-Fixierungszeit ( $n=2$ , Mittelwert+SD).

Im T-Test waren die Unterschiede nicht signifikant (Patient 1:  $P=0.6661$ , Patient 2:  $P=0.9160$ ). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im Folgenden eine Fixierdauer von 15 Sek. angewendet. Damit wurde auch eine Überfixierung ausgeschlossen.

### 3.3.3 Einfluss der Well-Konstruktionen mittels Tesafilm

Es galt die Unebenheiten zu beheben, die die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Fixative weiterhin störte. Dabei entstand die Idee einer Well-Konstruktion mittels Tesa-Film (i) als seitliche Umrahmung zur Minimierung des Reaktionsvolumens und (ii) zur Erlangung einer einheitlichen Höhe der Flüssigkeitssäule (s.

Abb. 2.3).

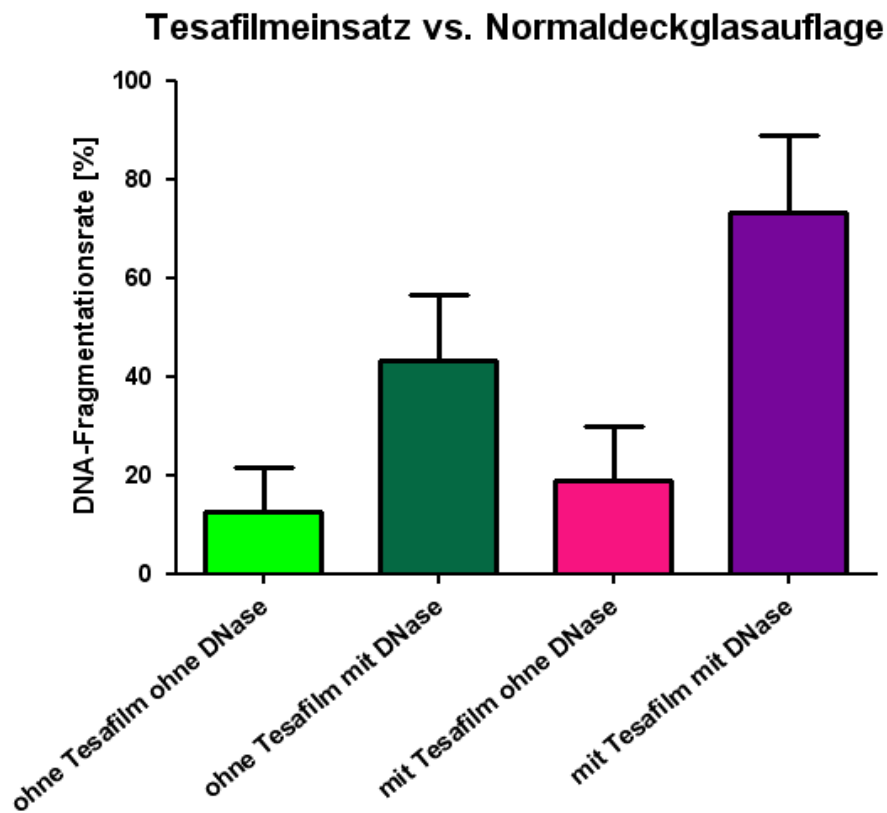


Abb. 3.9: Vergleich der DNA-Fragmentationsraten nach TUNEL-Reaktion auf Objektträgern mit und ohne Tesafilm-Einsatz sowie mit und ohne Turbo-DNase-Einsatz ( $n=4$ , Mittelwert+SD).

Ohne Einsatz von DNase zeigte der T-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen Objektträgern mit und ohne Well-Konstrukt ( $P=0.4172$ ).

Nach DNase-Einsatz zeigte sich dagegen ein signifikanter Unterschied ( $P=0.0258$ ), und die DNA-Fragmentationsrate in den Positiv-Kontrollen erreichte maximale Werte. Die Well-Konstruktion war demnach geeignet, das Ergebnis der Positiv-Kontrolle zu verbessern. Insgesamt war die Variabilität aber weiterhin hoch (vergleiche Abb. 3.10). Mithilfe des Tesafilm-Einsatzes konnte das Problem der Inhomogenität der TUNEL-Reaktion auf dem Objektträger also nicht völlig behoben, aber deutlich reduziert werden.

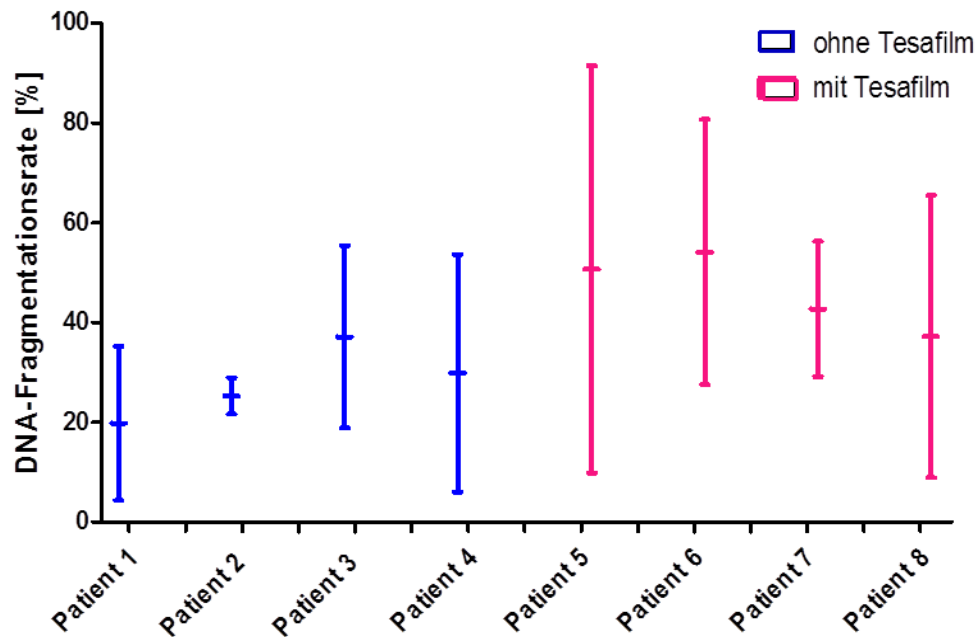
**DNA-Fragmentationsrate-Anstieg mit oder ohne Tesafilm Einsatz**

Abb. 3.10: Spannbreite des Zuwachses von DNA-Fragmentation nach TUNEL-Test mit Turbo-DNase-Einsatz auf Objektträgern mit und ohne Tesafilm-Applikation ( $n=8$ , Mittelwert+SD).

**3.3.4 Vergleich der Einflüsse von Mikrowellenfixierung und 4% PAF**

Als Nächstes sollte die Methode der Mikrowellenfixierung mit der bei der TUNEL-Reaktion üblicherweise eingesetzten PAF 4%-Fixierung verglichen werden. Diese Fixierung wird auch im Handbuch von Roche (Roche, 2006) empfohlen.

Obwohl es sowohl mit als auch ohne DNase-Einsatz keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Fixierungsmethoden gab (Abb. 3.11 und 3.12), bietet die Mikrowellenfixierung dennoch Vorteile gegenüber der PAF 4%-Fixierung: sie ist kostengünstiger, schneller, weniger gesundheitsschädlich und einfacher in der Durchführung. Deshalb wurde die Mikrowellenfixierung für die folgenden Versuche als Standard verwendet.

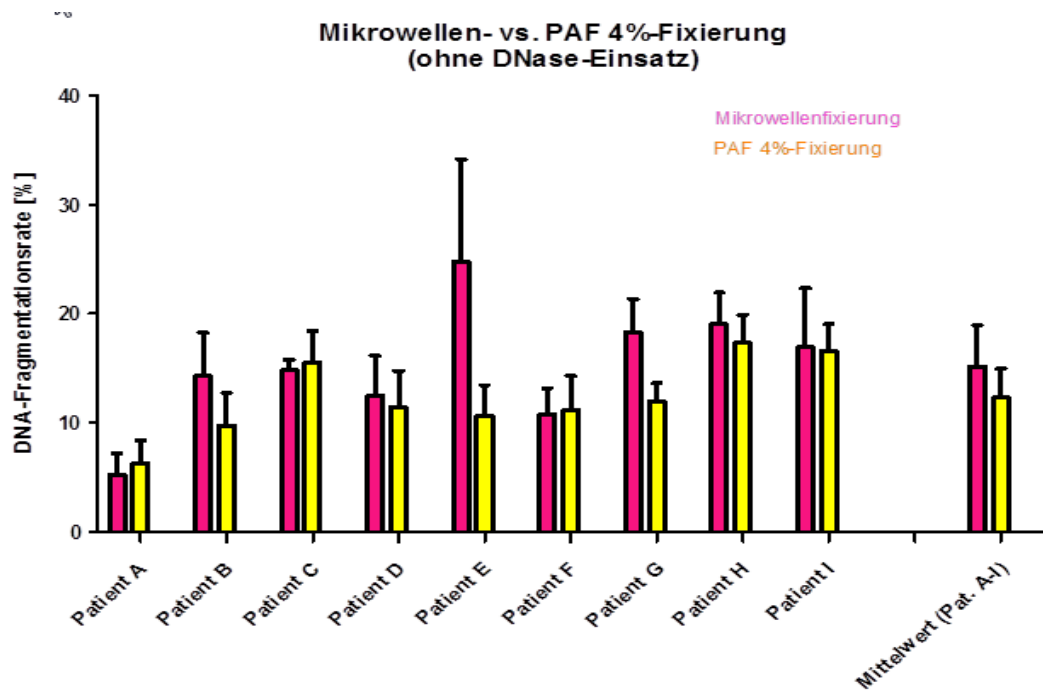


Abb. 3.11: Vergleich von DNA-Fragmentationsraten zwischen Mikrowellenfixierung und PAF 4%-Fixierung nach TUNEL-Reaktion ohne DNase-Einsatz ( $n=9$ , Mittelwert+SD).

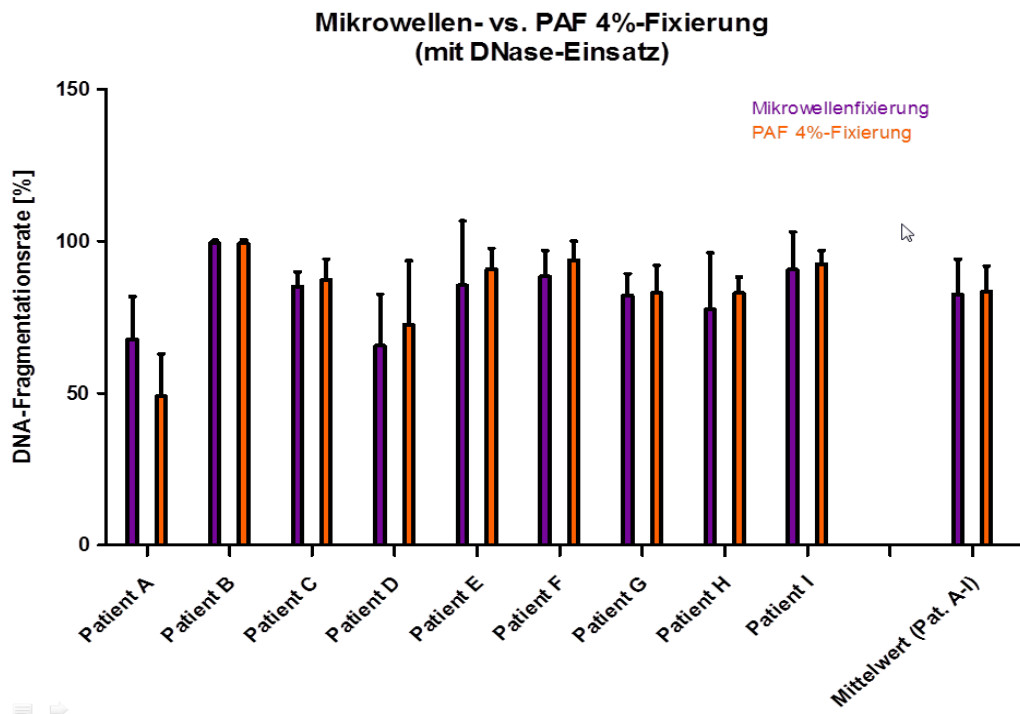


Abb. 3.12: Vergleich von DNA-Fragmentationsraten zwischen Mikrowellenfixierung und PAF 4%-Fixierung nach TUNEL-Reaktion mit DNase-Einsatz ( $n=9$ , Mittelwert+SD).

### 3.4 Einflüsse der Permeabilisierung auf den TUNEL-Test

#### 3.4.1 Permeabilisationslösung 1 vs. Permeabilisationslösung 2

Beim Vergleich zweier Permeabilisationslösungen sollte getestet werden, ob das Ergebnis der TUNEL-Reaktion durch eine Säuredenaturierung der Spermien-DNA beeinflusst wird. Die mögliche Folge davon wäre die Erhöhung der DNA-Fragmentationsrate bei Verwendung der Permeabilisationslösung 2 (pH=2,4) gegenüber der Standard-Permeabilisationslösung = Permeabilisationslösung 1 (pH=7,6) (Abb. 3.13).

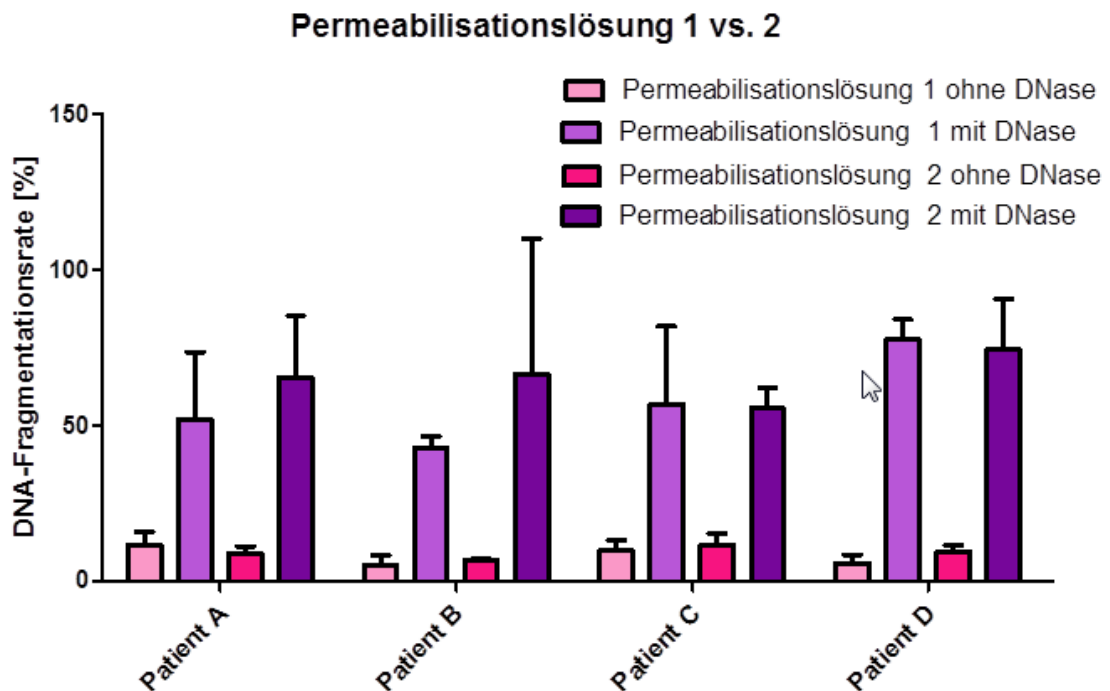


Abb. 3.13: Vergleich zwischen Permeabilisationslösung 1 und 2 nach TUNEL-Test ohne / mit Turbo-DNase ( $n=4$ , Mittelwert+SD).

Es zeigte sich, dass der pH-Unterschied keine signifikante Auswirkung auf das Ausmaß der DNA-Fragmentation hatte (Abb. 3.13). Die Mittelwerte betragen für den TUNEL-Test ohne DNase-Einsatz bei der Permeabilisationslösung 1 (pH=7,6) 15,18% und bei der Permeabilisationslösung 2 (pH=2,4) 12,3%. Mit DNase-Einsatz betragen die Mittelwerte 82,44% für die Permeabilisationslösung 1 und 83,43% für die Permeabilisationslösung 2. Der T-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede für die beiden Permeabilisationslösungen, sowohl ohne ( $P=0,2081$ ) als auch mit ( $P=0,8745$ ) DNase-Einsatz.

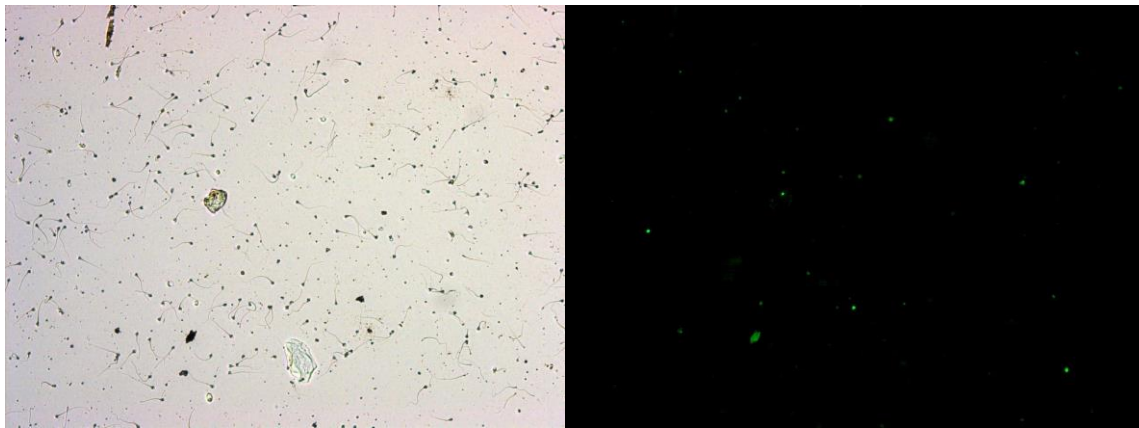


Abb. 3.14: Permeabilisationslösung 1 ohne Turbo-DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzmikroskopie) bei 10-facher Vergrößerung.

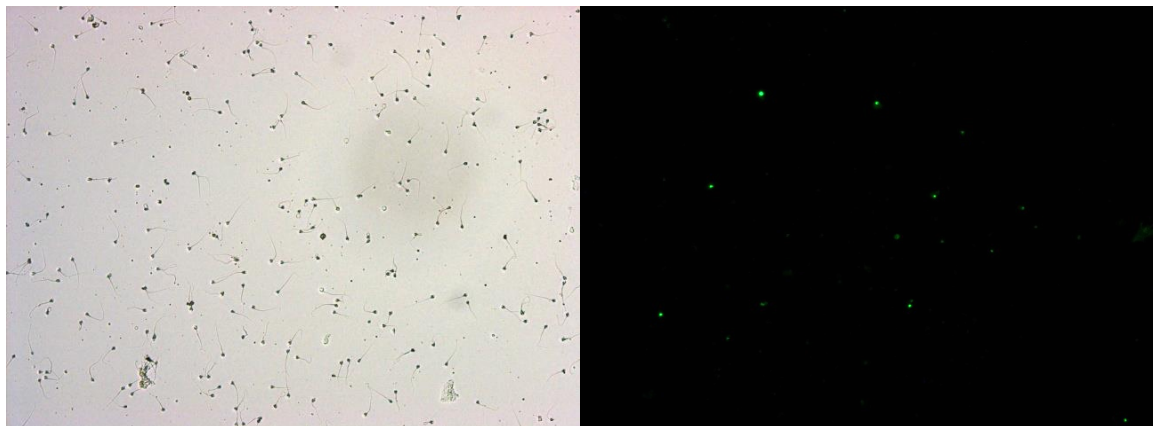


Abb. 3.15: Permeabilisationslösung 2 ohne Turbo-DNase-Einsatz (links BF-Bild; rechts: Fluoreszenzmikroskopie) bei 10-facher Vergrößerung.

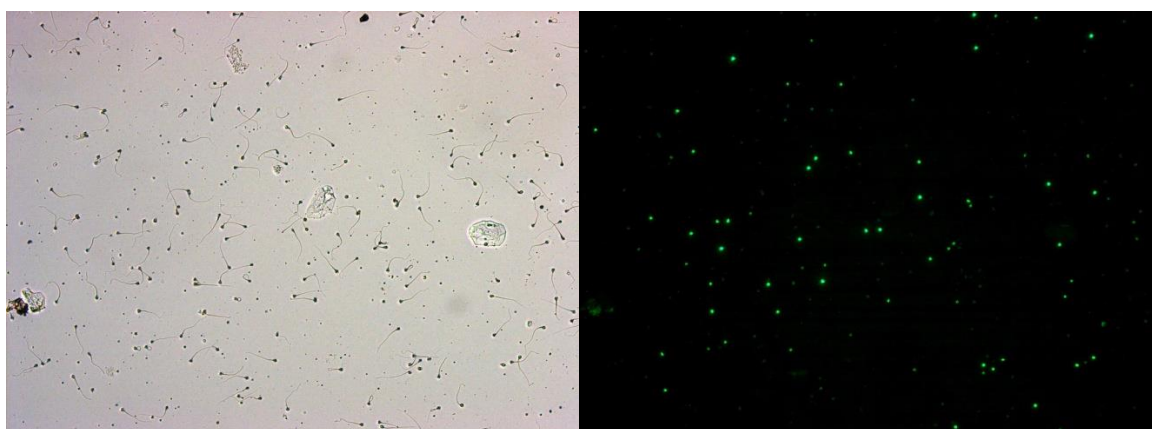


Abb. 3.16: Permeabilisationslösung 1 mit Turbo-DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzmikroskopie) bei 10-facher Vergrößerung.

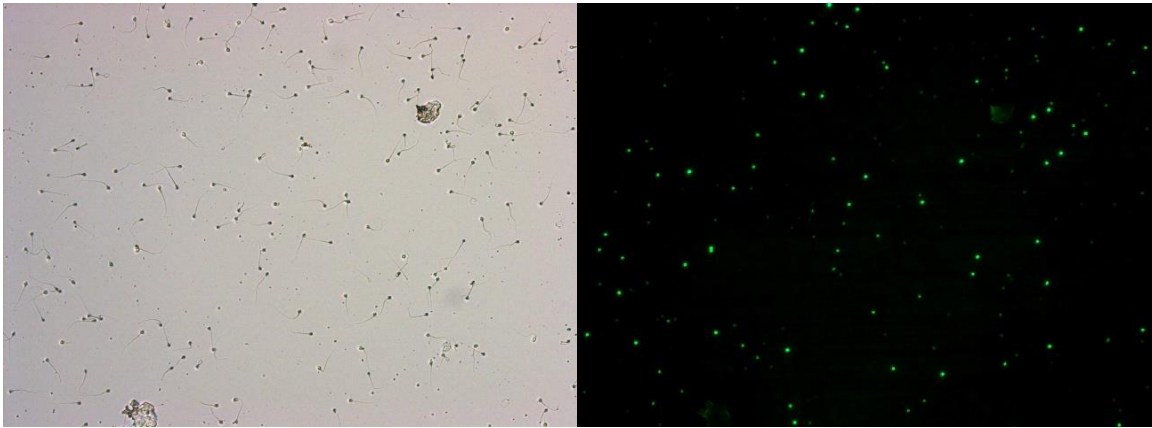


Abb. 3.17: Permeabilisationslösung 2 mit Turbo-DNase-Einsatz (BF-Bild; rechts: Fluoreszenzmikroskopie) bei 10-facher Vergrößerung.

Auf den Fluoreszenzbildern (Abb. 3.14-3.15 und 3.16-3.17) wird auch visuell deutlich, dass die TUNEL-Fluoreszenz bei Verwendung beider Permeabilisationslösungen mit und ohne DNase-Einsatz gleich groß ist.

### 3.4.2 Einfluss der Zitrat-Konzentration auf die DNA-Fragmentationsrate

Es wurden drei Varianten der Permeabilisationslösung 2 hergestellt, und zwar mit den Konzentrationen 0,02%, 0,1% und 0,2% Zitronensäure (CA).

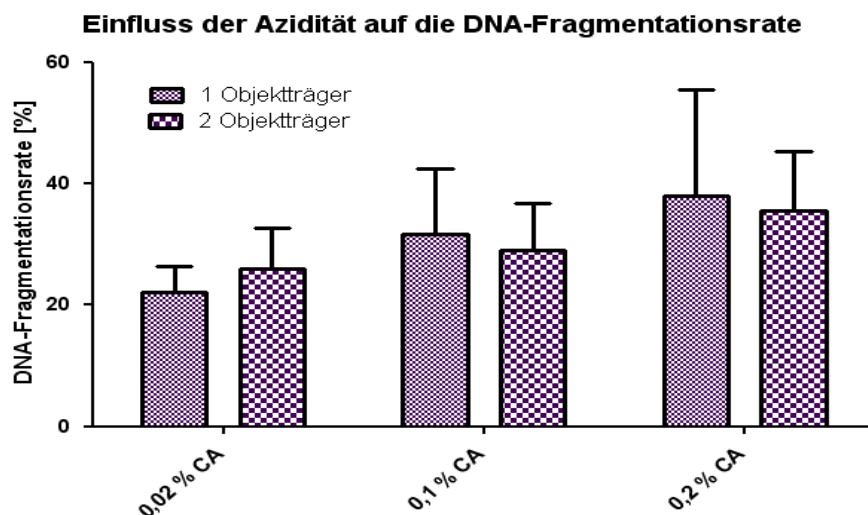


Abb. 3.18: Einflusses des Aziditäts-Grades der Permeabilisationslösung 2 bei 0,02%, 0,1% und 0,2% Zitronensäure (CA) auf die Höhe der DNA-Fragmentationsrate ( $n=2$ , Mittelwert+SD).

Es zeigte sich die Tendenz, dass die DNA-Fragmentation mit steigender Zitrat-Konzentration zunimmt (Abb. 3.18). Im T-Test bestand ein signifikanter Unterschied aber nur zwischen 0,02% CA und 0,2% CA ( $P=0,0298$ ).



### 3.4.3 Einfluss von Unebenheiten im Präparat

Um den Einfluss einer unregelmäßig hohen Flüssigkeitssäule über der Probe zu untersuchen, wurde ein Gradient mit abnehmender Flüssigkeitssäule auf dem Objektträger hergestellt (Abb. 2.4). Abb. 3.19 veranschaulicht, dass dieser Faktor einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis des TUNEL-Tests hat: Je höher die Flüssigkeitssäule über der Probe war, desto höhere DNA-Fragmentationsraten wurden ermittelt und umgekehrt.

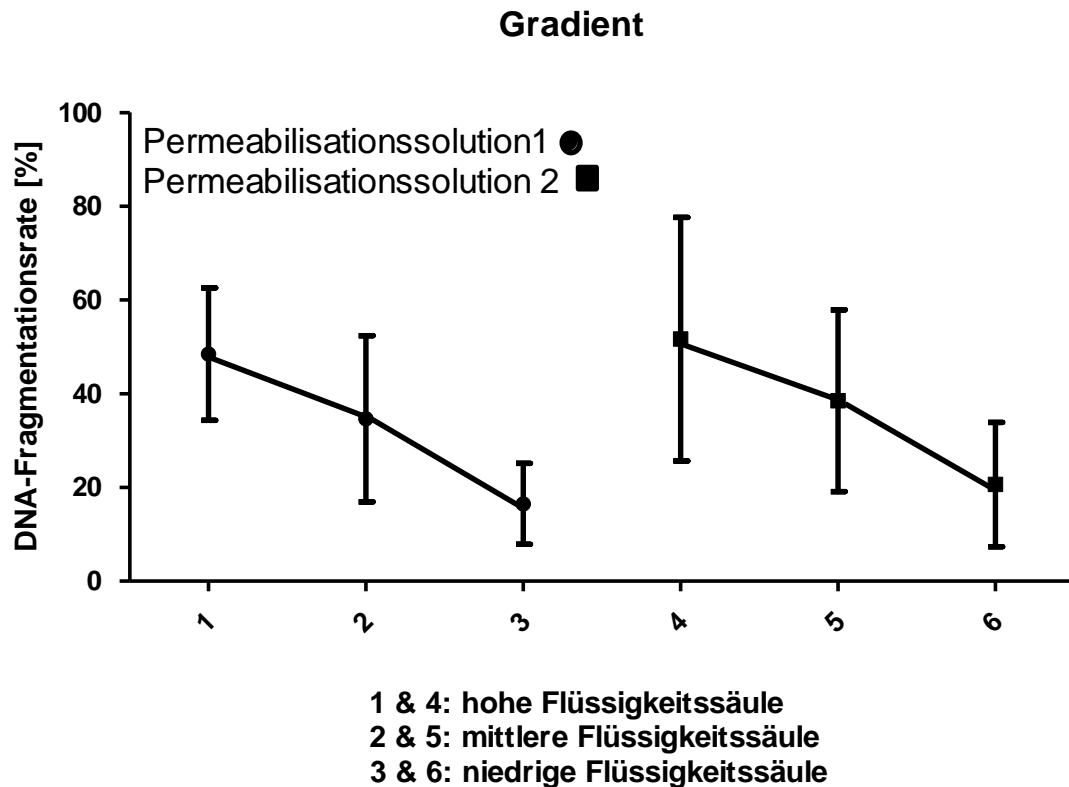


Abb. 3.19: Zusammenhang zwischen der DNA-Fragmentationsrate und der Höhe der Reagenzsäule (1/4=hohe, 2/5=mittlere und 3/6=niedrige) auf dem Objektträger ( $n=4$  für Permeabilisationssolution 1, Mittelwert+SD;  $n=7$  für Permeabilisationssolution 2, Mittelwert+SD).

Im T-Test ergab sich für Permeabilisations-Lösung 1 zwischen Abschnitt 1 und 2 keine Signifikanz. Dagegen ergab sich zwischen den Abschnitten 1 und 3 ein signifikanter Unterschied ( $P=0,0083$ ).

Auch für Permeabilisations-Lösung 2 ergab sich zwischen Abschnitt 1 und 2 sowie zwischen 2 zu 3 keine Signifikanz; zwischen den Abschnitten 1 zu 3 bestand aber wiederum ein signifikanter Unterschied ( $P=0,0156$ ). Damit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die gemessene DNA-Fragmentation stark von der Höhe der Flüssigkeitssäule auf dem Objektträger abhängt. Das bestätigt auch die visuelle Betrachtung der nachfolgend gezeigten Fluoreszenzbilder von Präparaten mit unterschiedlich hoher Flüssigkeitssäule (Abb. 3.20 bis 3.23).

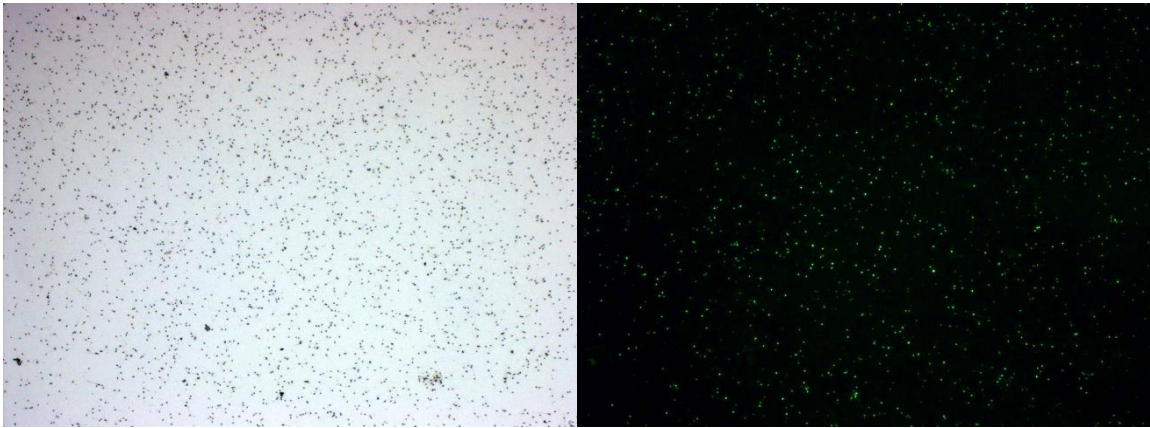


Abb. 3.20: ausgestrichenes Ejakulat in Höhe der höchsten Flüssigkeitssäule (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild) bei 4-facher Vergrößerung.

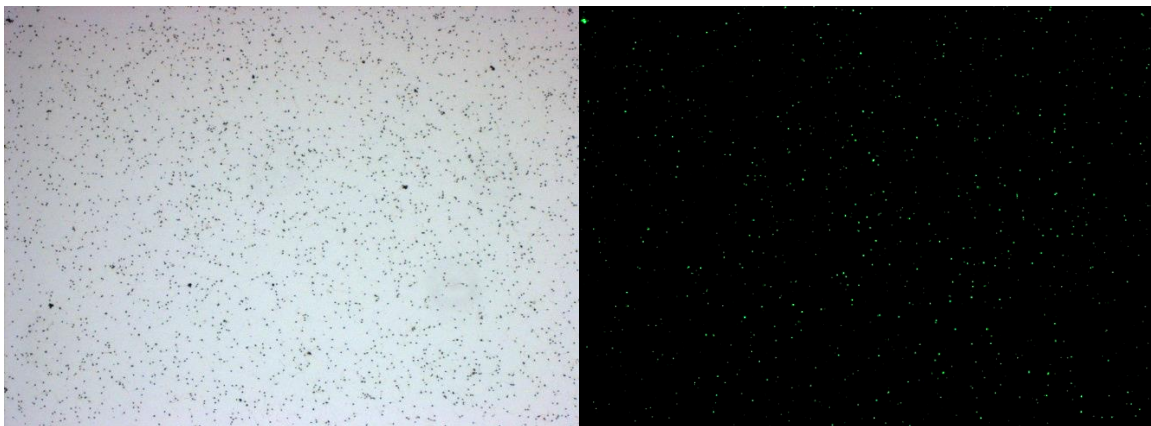


Abb. 3.21: ausgestrichenes Ejakulat in Höhe der zweithöchsten Flüssigkeitssäule (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild) bei 4-facher Vergrößerung.

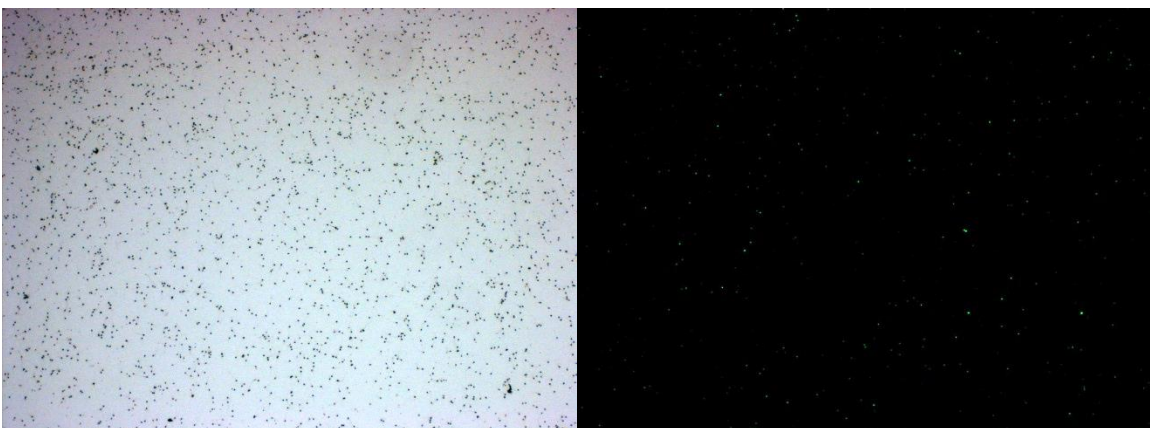


Abb. 3.22: ausgestrichenes Ejakulat in Höhe der mittleren Flüssigkeitssäule (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild) bei 4-facher Vergrößerung.

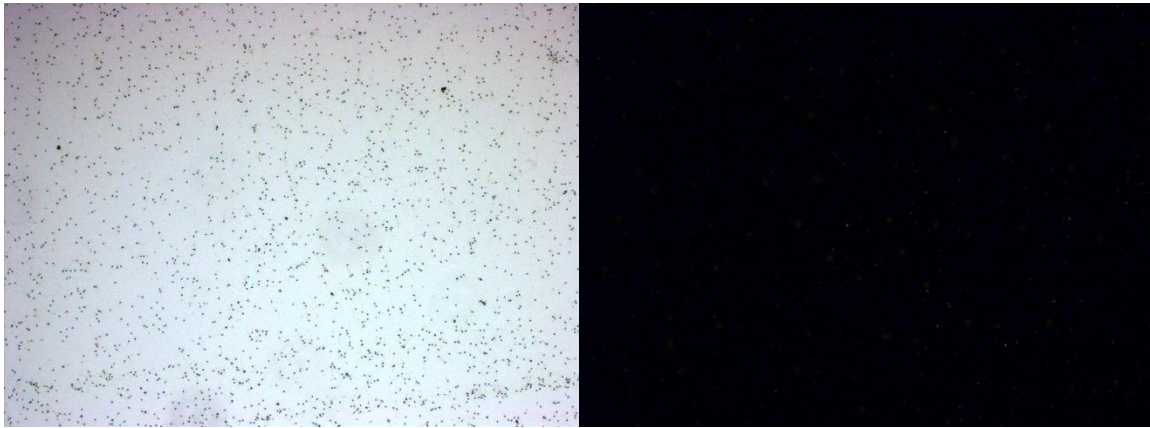


Abb. 3.23: ausgestrichenes Ejakulat in Höhe der niedrigsten Flüssigkeitssäule (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild) bei 4-facher Vergrößerung.

### 3.4.4 Einfluss des Einsatzes von DNase

In der Folge war es nun möglich, die nativen DNA-Fragmentationsraten mit denen der Positivkontrolle (nach Verwendung von Turbo-DNase) zu vergleichen (Abb. 3.24, Tabelle 1).

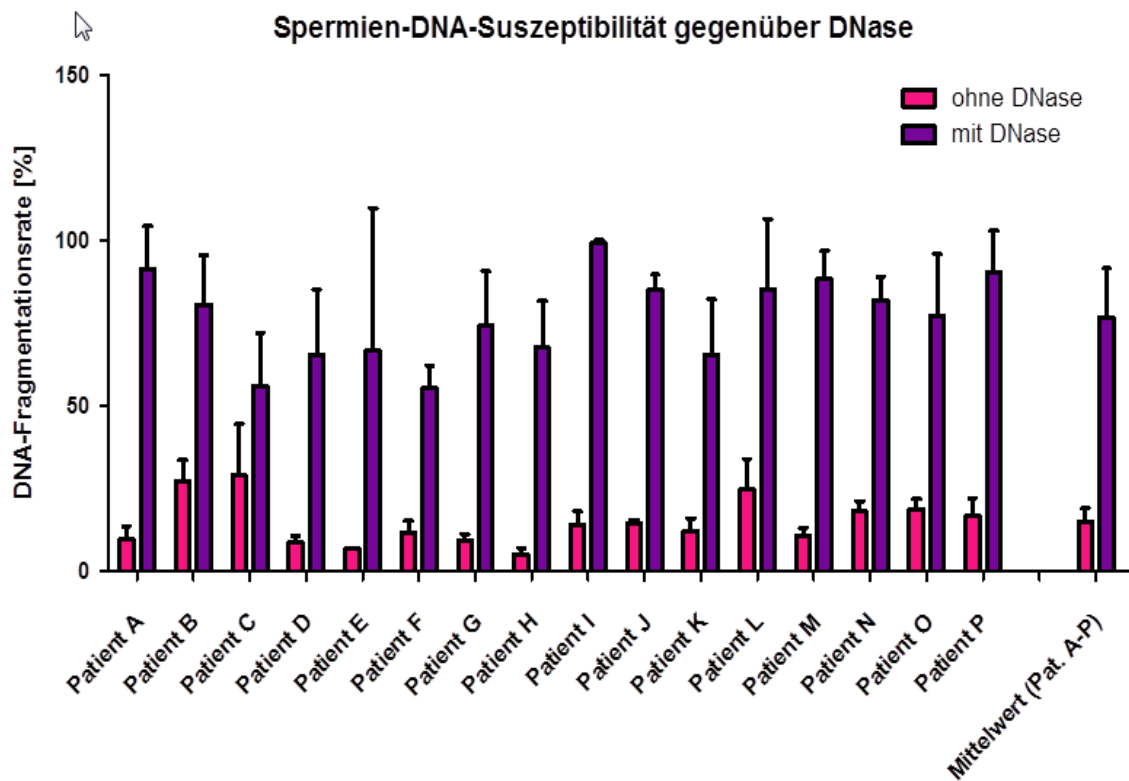


Abb. 3.24: Vergleich von nativen DNA-Fragmentationsraten nach TUNEL-Test (ohne DNase-Einsatz) mit den entsprechenden Positiv-Kontrollen derselben Probe (ausgestrichene Ejakulate,  $n=16$ , Mittelwert+SD).

Zu beobachten war, dass sich die DNA-Fragmentationsrate nach DNase-Einsatz nicht proportional zum Ausgangsniveau der nativen Präparate veränderte. Zu beachten ist auch, dass beide Werte eine hohe interindividuelle Variabilität aufwiesen (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: native DNA-Fragmentationsraten [%] von Patient A bis P (grün:  $\geq 10\%$ ; gelb:  $\geq 15\%$ ; blau:  $\geq 20\%$ ; rot:  $\leq 20\%$ ) und ihr absoluter Anstieg [%] bzw. ihre absolute Anstiegsdifferenz [%] nach der Positivkontrolle

Patient	native Fragmentationsrate [%]	induzierte Fragmentationsrate [%]	Zuwachs der Fragmentationsrate [%]
A	9,81	91,46	81,65
B	27,54	80,72	53,18
C	29,14	56,23	27,09
D	8,86	65,44	56,58
E	6,89	66,65	59,76
F	11,7	55,48	43,78
G	9,49	74,29	64,8
H	5,27	67,79	62,52
I	14,28	99,32	85,04
J	14,79	85,09	70,3
K	12,48	65,64	53,16
L	24,74	85,42	60,68
M	10,8	88,4	77,6
N	18,28	82,18	63,9
O	19,02	77,49	58,47
P	16,92	90,65	73,73

### 3.5 Untersuchungen der DNA-Fragmentation in Spermien aus Hodengewebe

Literaturdaten zufolge weisen aus dem Hoden extrahierte Spermien im Vergleich zu ejakulierten Spermien niedrigere DNA-Fragmentationsraten auf, falls keine Spermatogenese-Störung vorliegt. Dies sollte im Folgenden näher untersucht werden. Das Problem war hierbei, dass die Mikrowellenfixierung testikuläre Spermien bei weitem nicht so gut fixierte wie Ausstriche von Spermien aus Ejakulaten. Nach dem ersten Waschgang verblieben weniger als 90% der testikulären Spermien auf dem Poly-L-lysinbeschichteten Menzel-Objektträger haften. Auch erschwerte die Vielfalt der Zelltypen aus einer Hodenbiopsie die Untersuchung.

Deshalb wurde in den nachfolgenden Untersuchungen doch wieder die PAF-Fixierung zum Vergleich herangezogen. Es verblieben im Durchschnitt ca.  $\leq 95\%$  Spermien haften. Der Nachteil der PAF-Fixierung war, dass hierbei zusätzlich andere Zelltypen und anderweitige Partikel mithaften blieben und die Qualität des Ausstriches somit verringert war. Der T-Test ergab für den Vergleich der beiden Fixierungsmethoden ohne DNase-Einsatz keine Signifikanz ( $P=0,6766$ ). Mit DNase-Einsatz ergab sich eine Signifikanz von  $P=0,0260$ . Hier war die DNA-Fragmentationsrate nach PAF-Fixierung gegenüber der Mikrowellenfixierung signifikant erhöht (s. Abb. 3.25).

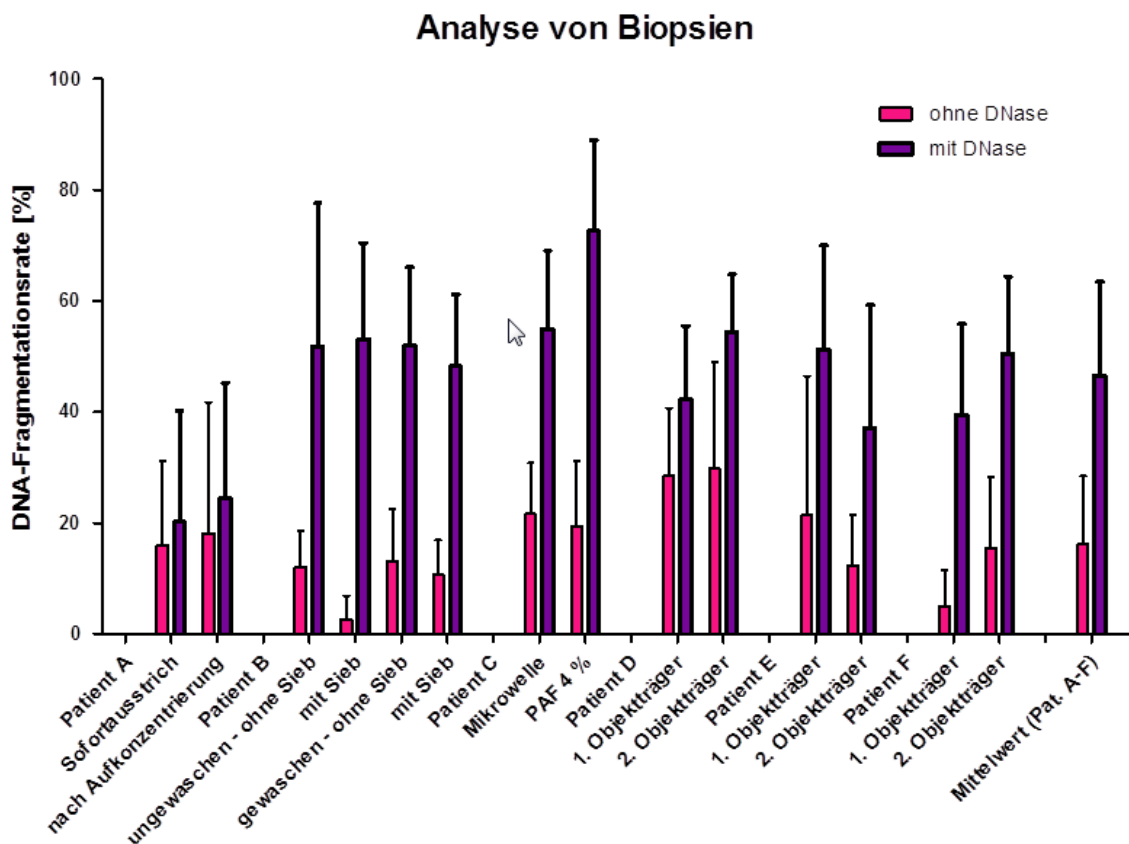


Abb. 3.25: DNA-Fragmentationsrate in Biopsien nach TUNEL-Test ohne / mit Turbo-DNase bezogen auf Spermien ( $n=6$ , Mittelwert + SD). Bei jeder Probe wurden pro Objektträger 200 Spermien ausgezählt.

Wie in Abb. 3.25 zu sehen ist, wurden die Proben für den Spermienausstrich unterschiedlich aufbereitet, um eine optimale Methode zu finden. So wurde versucht, die extrahierten Spermien aufzukonzentrieren. Die Spermienkonzentration hatte aber keinen Einfluss auf die DNA-Fragmentation (s. Patient A). Die Ergebnisse mit und ohne zusätzlichen Waschschrift waren ebenfalls nahezu identisch. PBS hatte keinen Einfluss auf die gemessene DNA-Fragmentation, wie zunächst aufgrund von vorliegenden Na-Kristallen vermutet wurde (Martin *et al.*, 2006). Der zusätzliche Waschschrift brachte aber auch keinen sichtbaren Vorteil und wurde deswegen im Folgenden unterlassen. Auffällig ist wiederum die hohe Variabilität der Ergebnisse. Der mögliche Grund hierfür kann die extrem schwierige Auszählung, bedingt durch die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen (im Unterschied zu den Ejakulaten) sein. Interessant war bei allen Patienten der prozentuale Anteil der DNA-Fragmentation ohne DNase-Einsatz. Die Vermutung, dass testikuläre Spermien allgemein eine niedrigere DNA-Fragmentation aufweisen, wurde hier nicht bestätigt.

### 3.6 DNA-Fragmentation Hyaluronat-bindender Spermien

Versuche mit PICS-Schalen dienten der Überprüfung der Hypothese, dass die an Hyaluronsäure (HA) bindenden Spermien eine erniedrigte DNA-Fragmentationsrate gegenüber dem gesamten Spermienpool eines Patienten aufweisen (Yagci *et al.*, 2010; Huszar *et al.*, 2006). Auf der PICS-Schale befindet sich das Hyaluronat in drei makroskopisch kaum sichtbaren Mikrotropfen. Im Folgenden fügte man standardmäßig 20 µl des reinen Ejakulats je HA-Spot hinzu, sodass die Zahl der gebundenen Spermien von der Ejakulatspermienzahl abhängig war.

Abb. 3.26 verdeutlicht, dass die HA- gebundenen Spermien eines Patienten eine deutlich niedrigere DNA-Fragmentationsrate aufweisen als der Gesamtpool vom selben Ausstrich. Der T-Test war mit  $P=0,0065$  hoch signifikant und bestätigte die Funktionsweise der PICS-Schalen in Bezug auf die Selektion reifer, motiler Spermien mit erniedrigter DNA-Fragmentationsrate. Bei der Positivkontrolle, also nach DNase-Behandlung (Abb. 3.27) zeigten sich, wie erwartet, dagegen keine Unterschiede.

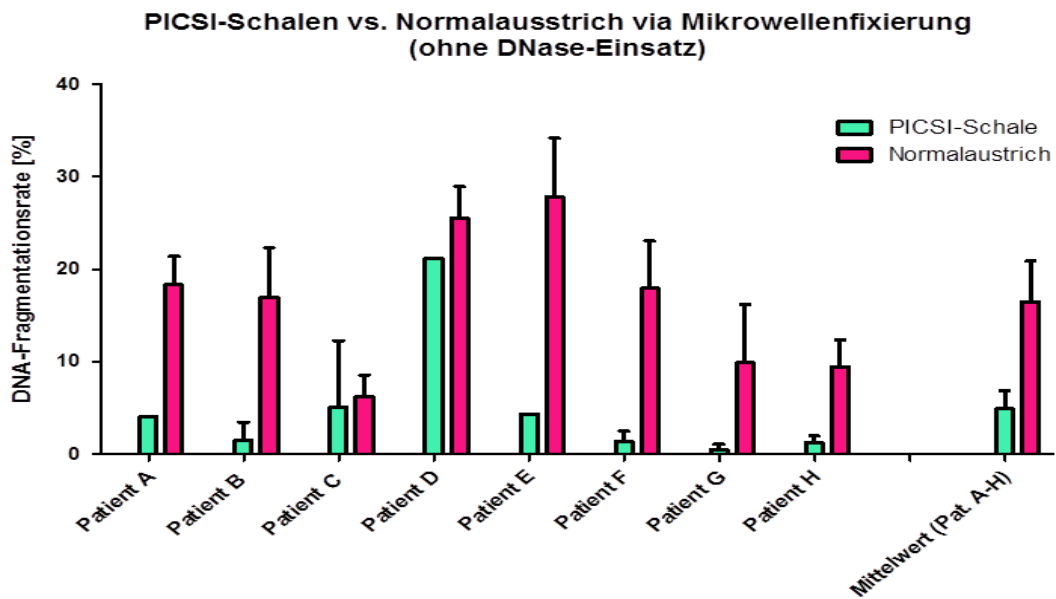


Abb. 3.26: Vergleich zwischen DNA-Fragmentationsraten der an HA-Spots der PICSI-Schale gebundenen Spermien und den DNA-Fragmentationsraten von Ejakulatausstrichen (mikrowellenfixiert) nach TUNEL-Test ohne DNase-Einsatz ( $n=8$ , Mittelwert+SD).

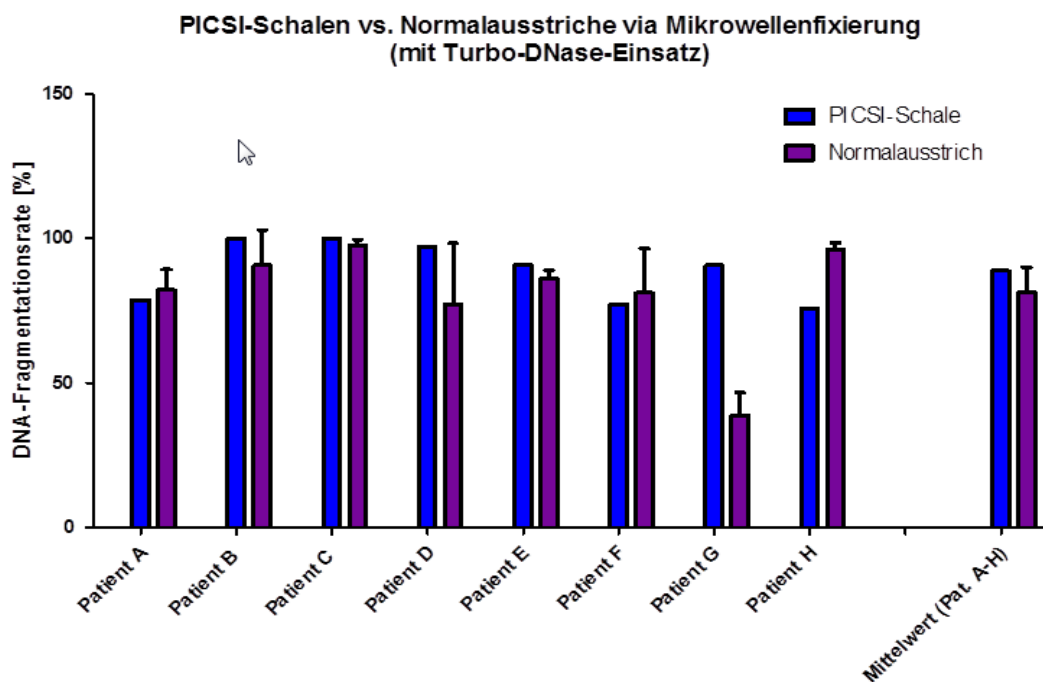


Abb. 3.27: Vergleich zwischen DNA-Fragmentationsraten der an HA-Spots der PICSI-Schale gebundenen Spermien und den DNA-Fragmentationsraten von Ejakulatausstrichen, mikrowellenfixiert, nach TUNEL-Test mit Turbo-DNase-Einsatz ( $n=8$ , Mittelwert+SD).

Das bestätigt auch wieder die visuelle Betrachtung der nachfolgend gezeigten Fluoreszenzbilder von ausgewählten HA-Mikrotropfen aus PICSI-Schalen zweier Patienten (Abb. 3.28 bis 3.31).

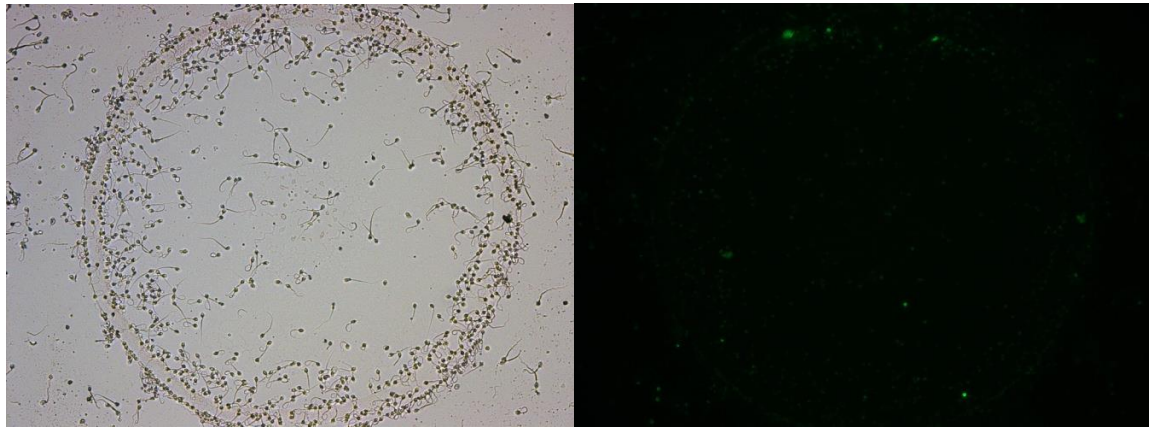


Abb. 3.28: HA-Mikrotropfen nach TUNEL-Test ohne DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild).

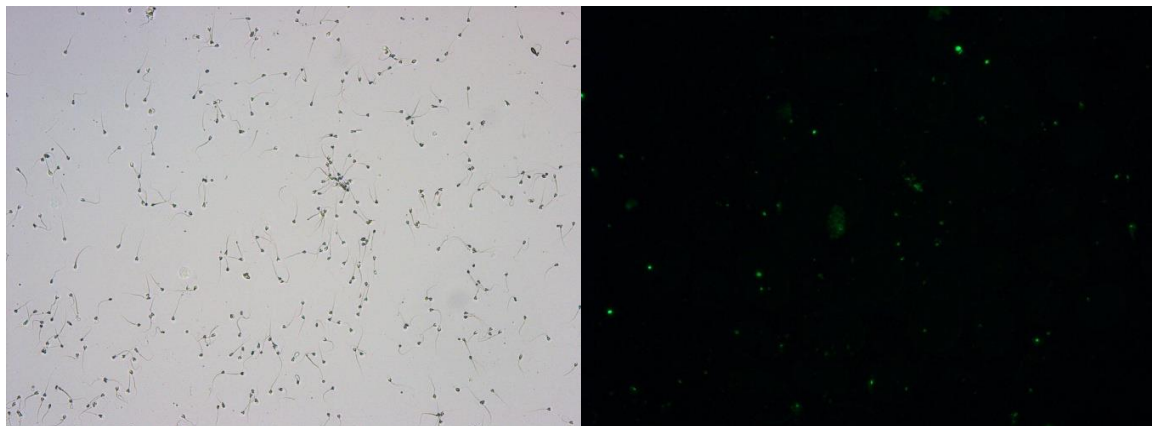


Abb. 3.29: Spermienausstrich desselben Patienten ohne DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild).

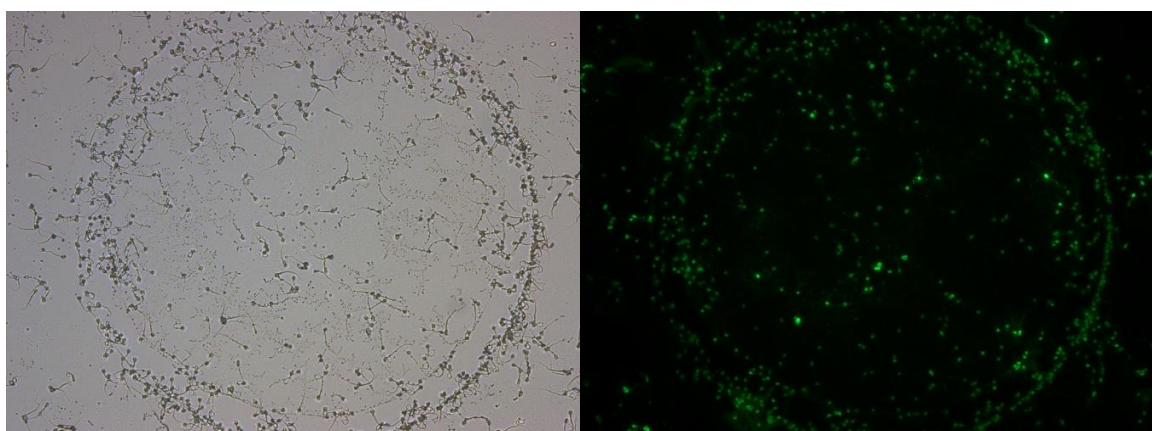


Abb. 3.30: HA-Mikrotropfen nach TUNEL-Test mit DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild).



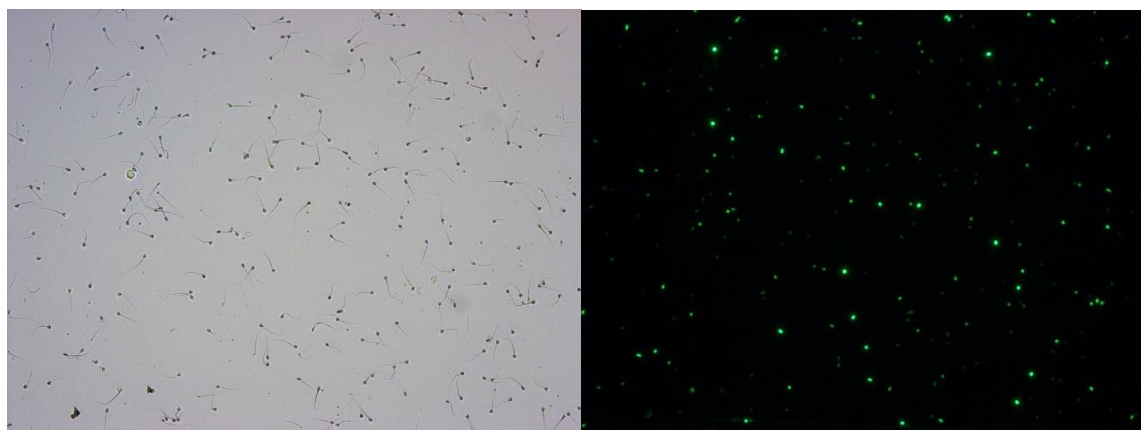


Abb. 3.31: Spermienausstrich desselben Patienten mit DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild).

## 4 Diskussion

Die Bestimmung der DNA-Fragmentationsrate ist ein aktuelles Diskussionsthema in der andrologischen Klinik. Im Rahmen dieser Dissertation wurden ein Methodenvergleich und die Methodenoptimierung speziell des TUNEL-Tests auf Objektträgern angestrebt. Als ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit soll bereits an dieser Stelle betont werden, dass sich die von Evenson *et al.* (2002) geäußerten Bedenken bezüglich der mikroskopischen Auswertung auf Objektträgern, vor allem bedingt durch Inhomogenitäten der Färbeintensität, in dieser Studie bestätigt haben.

Dieses Inhomogenitätsproblem innerhalb des TUNEL-Tests konnte mehrere Ursachen haben. Der Einfluss verschiedener Faktoren (vergleiche Abb. 4.1, linke Seite) wurde systematisch durch geeignete methodische Variationen untersucht (vergleiche Abb. 4.1, rechte Seite) und weiter unten im Einzelnen diskutiert.

<b>Aufbereitung der Proben</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Waschung vs. keine Waschung</i></li> <li>• <i>Einwirkzeit der Kollagenase (Biopsie)</i></li> </ul>
<b>Objektträger</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Austesten unterschiedlicher Objektträger</i></li> <li>• <i>Einsatz von Tesafilm</i></li> </ul>
<b>Fixierungen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>PAF 4%-Fixierung vs. Mikrowellenfixierung</i></li> </ul>
<b>TUNEL-Test-Aufbereitung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Permeabilisationslösung 1 vs. 2</i></li> <li>• <i>DNase- 1 vs. Turbo-DNase-Einsatz</i></li> </ul>
<b>TUNEL-Test</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>SCSA- / AO-Test</i></li> <li>• <i>Parameter wie Größe der Reagenzfläche und ihre Schichtdicke</i></li> <li>• <i>Ejakulat</i></li> <li>• <i>Biopsie</i></li> <li>• <i>PICSI-Schale</i></li> </ul>
<b>Auswertung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Fluoreszenzmikroskopie cellP</i></li> <li>• <i>AxioVision</i></li> <li>• <i>manuelle Auszählung</i></li> </ul>

Abb. 4.1: Darstellung der wesentlichen Schritte des TUNEL-Tests (links auf den großen Kästchen) mit Angabe der veränderten Variablen des jeweiligen Schrittes (*kursiv*).

Obwohl der TUNEL-Test auf Objektträgern prinzipiell erfolgreich durchgeführt werden konnte, gab es dauerhaft Probleme mit der Empfindlichkeit. So wurden in den Positiv-Kontrollen, also nach DNase-Verdau, nie 100%-Werte der DNA-Fragmentation erreicht. Die Positiv-Kontrollen zeigten zudem starke Schwankungen, die nicht mit den DNA-Fragmentationsraten der nativen Ausstriche korrelierten. Es ist bekannt, dass zur Erhöhung der TUNEL-Empfindlichkeit vor allem zwei Schritte optimiert werden müssen, die Fixierung und der Proteinase K-Verdau (Loo, 2011). Letzterer wurde in dieser Arbeit aber nicht in die methodischen Überlegungen einbezogen. Das Problem einer Überfixierung, die ebenfalls die Empfindlichkeit beeinträchtigt, kam durch die sehr kurze Dauer der Mikrowellenfixierung vermutlich nicht zum Tragen. Tatsächlich scheint die Mikrowellenfixierung auf Objektträgern die Methode mit der höchsten TUNEL-Empfindlichkeit und Spezifität zu sein (vergleiche Negoescu *et al.*, 1996).

Als eine wesentliche Ursache der mangelnden Reproduzierbarkeit erwies sich die Unebenheit der Präparate. Das Erzeugen einer einheitlichen Flüssigkeitssäule über dem Spermienausstrich ist von zentraler Bedeutung für das TUNEL-Ergebnis, in der Praxis aber schwer zu erreichen. Unterschiedliche Vorgehensweisen bei Fixation und Permeabilisierung hatten demgegenüber geringen Einfluss; Einflüsse von Licht und Umgebungstemperatur wurden nicht getestet.

Ein direkter Vergleich zwischen TUNEL- und SCSA/AO-Test auf demselben Objektträger erwies sich als nicht durchführbar, ebenso wenig die Computer-gestützte Bildauswertung.

Hyaluronat-bindende Spermien aus PICS-Schalen wiesen im TUNEL-Test eine signifikant verringerte DNA-Fragmentationsrate gegenüber dem Gesamtpool der Spermien auf.

## **4.1 Diskussion der einzelnen Methoden**

### **4.1.1 Probleme bei der computergestützten Bildauswertung**

Obwohl das Ejakulat nur wenige unterschiedliche Zelltypen enthält, stellt es keinen einheitlichen Zellverbund dar. Vielmehr werden bei vielen Männern neben Spermien auch Leukozyten und sog. Rundzellen in unterschiedlichen Anteilen angetroffen. Dadurch, dass die Zellformen bereits innerhalb eines Ejakulats teilweise stark voneinander abwichen, mussten die computergestützten Einstellungen zur Erkennung der Spermien mit hoher Toleranz gesetzt werden. Das galt insbesondere für Ausstriche aus Hodenbiopsien, in denen neben Spermien auch Keimzellen unterschiedlicher Reifungsstadien vorzufinden sind. Eng beieinander liegende Spermienköpfe werden vom Computer als ein Partikel identifiziert. Ein mögliches Miterfassen von Schmutzpartikeln oder Kristallen stellte ein weiteres Problem dar. Die Partikel stammten entweder aus dem Ejakulat bzw. der Biopsie oder waren Produkte der eingesetzten Reagenzien, z.B. PBS- und Permeabilisationslösungen sowie der eingesetzten Fixativa. Unterschiedliche Methoden

fürten zu unterschiedlichen Partikelgrößen. Zusätzlich stellten Vakuolen in Spermienköpfen ein weiteres Hindernis für die computergestützte Auszählung dar. Bei der Auszählung von Grün- und Rotanteilen nach SCSA/AO-Test spielte außerdem die Justierung der Farbschwellwerte eine große Rolle.

Somit war der Arbeits- und Zeitaufwand zur Einstellung der wechselnden Parameter bei der computergestützten Auswertung mit der vorliegenden Arbeit zum Methodenvergleich nicht vereinbar. Anders gestaltete es sich, wenn man sich nur auf eine Art von Proben, wie beispielsweise das Ejakulat, und eine bestimmte Aufbereitungsmethode festlegte. Bei gleicher Qualität der einzelnen Bilder ist die computergestützte Auswertung in ihrer Objektivität und Treffsicherheit dem menschlichen Auge sicherlich überlegen. Im Rahmen dieser Dissertation war der subjektive Einfluss des menschlichen Auges jedoch nicht zu umgehen.

#### 4.1.2 Vergleichbarkeit von SCSA- und TUNEL-Test

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Methoden sollten beide auf demselben Objektträger durchgeführt werden. Grundsätzlich ist eine Doppelmarkierung von Zellen in Verbindung mit dem TUNEL-Test möglich (Negoescu *et al.*, 1996; 1998); die Anwendung des SCSA/AO-Assays auf zuvor TUNEL-markierten Spermien ist aber aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse gescheitert. Eine Erklärung dafür wäre das Phänomen des Quenchings. Möglicherweise führte eine Komplex-Bildung, interne Konversion oder Energie-Übertragung auf andere Moleküle, sogenannte Quencher, im vorliegenden Beispiel evt. auf Biotin-dUTP bzw. an den daran gebundenen fluoreszierenden Antikörper, zur einer Fluoreszenzlöschung des Fluorophors aus dem SCSA-Test (Osterman, 2009; Peng *et al.*, 2009). Es ist bekannt, dass beispielsweise der Einbau von BrdU in die DNA die Fluoreszenz von Acridin Orange quenched und eine Verschiebung der Grünfluoreszenz ins Dunkelrote bewirkt (zusammengefasst in Darzynkiewicz *et al.*, 2011).

Das erklärt aber nicht den Befund, dass die gegen einander verschobenen Bilder von zuvor überlappendem TUNEL- mit SCSA-Test eine farbliche Übereinstimmung zeigten: im grünen Fluoreszenzkanal zeigten sich Spermien, die nach dem TUNEL-Test stark grün leuchteten, nach dem SCSA-Test als schwach grün und umgekehrt. Dagegen zeigte sich im roten Fluoreszenzkanal des SCSA-Tests eine entgegengesetzte farbliche Verhaltensweise gegenüber dem TUNEL-Test: Spermien, die im TUNEL stark grün fluoreszierten, waren kaum rot und umgekehrt. Möglicherweise haben auch andere Artefakte eine Rolle gespielt. Befinden sich mehrere Farbstoffe in einer Probe, oder bildet ein Farbstoff wie Acridin Orange mehrere DNA-Komplexe mit unterschiedlichen Spektren, kann es durch mangelnde Trennung der Anregungswellenlängen zur gleichzeitigen Anregung der Farbstoffe kommen (sog. Cross Talk); bei ungenügender Trennung der Emissionswellenlängen können die Farbstoffe nicht unterschieden werden (sog. Bleed through). Das Auftreten von Zwischenfarbtönen erschwert die Analyse zusätzlich und

fürte möglicherweise zu einer Fehldetektion mit der Folge, dass Zellen sowohl als grün als auch als rot erscheinen.

Auch ein Vergleich der beiden Tests auf separaten Objektträgern konnte nicht zur weiteren Auswertung herangezogen werden. Grund dafür waren Kristalle und andere Artefakte. Die Durchführung des modifizierten SCSA-Tests auf ausgestrichenen Objektträgern, wie von Tejada (1984) durchgeführt, konnte dementsprechend in dieser Arbeit nicht etabliert werden. Beim Vergleich der Fotos aus Grün- und Rotkanal, beobachtete man identische Farbintensitäten: Spermien, die im grünen Fluoreszenzkanal schwach / stark leuchteten, waren ebenso schwach / stark leuchtend im roten Fluoreszenzkanal. Es lässt sich vermuten, dass der SCSA-Test wohl nur in Kombination mit der Durchflusszytometrie optimale Ergebnisse liefert (vergleiche auch Evenson *et al.*, 2002).

#### **4.1.3 Modifikationen des TUNEL-Tests, Problematik des Objektträger-Verfahrens**

Wie von Evenson und anderen Autoren mehrfach beschrieben (z.B. Evenson & Wixon, 2006; Evenson, 1999), lässt sich mittels SCSA/AO-Färbung auf Objektträgern keine für klinische Zwecke ausreichende Reproduzierbarkeit erzielen. Kommerziell erhältliche Objektträger und Deckgläschen sind nicht völlig plan; die Unebenheiten bedingen eine ungleichmäßige Farbreaktion. Evenson und Wixon (2006) führen das vor allem auf die Empfindlichkeit der metachromatischen Acridin Orange-Färbung zurück, die die Einhaltung eines sehr genauen Verhältnisses von AO und Spermien-DNA erfordert. Tatsächlich wurde im Labor der Abteilung für Andrologie des UKE ein vergleichbares Phänomen auch im Zusammenhang mit der TUNEL-Färbung beobachtet (Duhnke, 2011), die auf ganz anderen Prinzipien beruht. Das Problem der inhomogenen TUNEL-Färbung äußerte sich bereits bei Ausstrichen desselben Ejakulats. Eine klinische Aussagekraft eines Tests ist aber erst dann gegeben, wenn der Test unter denselben Bedingungen reproduzierbar ist und eine niedrige Variabilität bei Replikaten einer Probe (technische Replikate) aufweist.

Der Austausch der ursprünglich benutzten DNase 1 (Roche) durch ein aktiveres Enzym (Turbo-DNase), der Einsatz einer höheren Menge an Enzym (2 µl Turbo-DNase auf 50 µl Puffer) sowie einer sechsfach verlängerten Inkubationszeit von 60 Min. steigerte zwar die Empfindlichkeit des Objektträger-Verfahrens, konnte das Problem der inhomogenen Färbung aber nicht beheben. Erst mit Hilfe des Einsatzes der Mikrowellen-Fixierung und von eigens konstruierten Objektträgern mit Tesafilmschichten wurde die TUNEL-Reaktion gleichmäßiger.

Zusätzlich zu den oft beobachteten Randeffekten bei der TUNEL-Färbung bestanden Ungleichmäßigkeiten auch in den mittleren Bereichen eines Objektträgers. Diese erschwerten eine Festlegung repräsentativer Objektträgerabschnitte und machten die Auswertung unzuverlässig. Wir vermuteten, dass die Höhe der Flüssigkeitssäule selbst

einen Einfluss hatte, der sich auch im Zusammenhang mit anderen Methoden zur Bestimmung der DNA-Fragmentation bemerkbar macht. Offenbar sind Objektträger-Verfahren zur Messung der DNA-Fragmentation von Spermien generell problematisch. Dies wurde in dieser Arbeit für den TUNEL-Test bestätigt (s. Abschnitt 3.4.3). Zur Verifizierung ist jedoch eine Untersuchung mit einer höheren Fallzahl erforderlich.

#### 4.1.4 Mikrowellenfixierung

Die Mikrowellenfixierung erwies sich als eine reproduzierbare, schnelle und günstige Fixierungsmethode von Ejakulat-Proben, die sich positiv auf die Spermienhaftung und die Homogenität der Ejakulat-Ausstriche auswirkte. Diese Beobachtung wird ebenfalls von verschiedenen Autoren bestätigt (Patterson & Bulard, 1980; Reipert *et al.*, 2008), vor allem in Kombination mit dem TUNEL-Test (Negoescu *et al.*, 1996). Unterschiedlich lange Fixierungszeiten hatten keinen Einfluss. Bei erhöhter Hitzeeinwirkung kommt es zu Schädigungen von Zellen (Reipert *et al.*, 2008), die sich in einer höheren Gesamt-DNA-Fragmentationsrate widerspiegeln könnten. Es liegen aber auch Daten vor, dass eine Überfixierung stattfinden kann, die die Empfindlichkeit der TUNEL-Reaktion herabsetzt. Zu einer genaueren Überprüfung in der Zukunft sollte hierbei neben der Länge der Fixierungszeit auch die Wattstärke berücksichtigt werden.

Da die Mikrowellen-Fixierung derzeit noch als unkonventionell angesehen wird, wurde sie einer gängigen Methode zur Fixierung von Ejakulat-Ausstrichen, nämlich der PAF-Fixierung, gegenübergestellt. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Höhe der DNA-Fragmentationsrate und sind einander gleichwertig. Für weiterführende Versuche zur Untersuchung der DNA-Fragmentationsrate ist die Mikrowellenfixierung aufgrund ihres positiven Einflusses auf die Homogenität, der Erleichterung in der Durchführung, der Schnelligkeit und der Kosten empfehlenswert.

Ein negativer Aspekt der Mikrowellenmethode war die unzureichende Fixierung von Zell-Ausstrichen aus Hodenbiopsien. Gründe dafür können sein:

1. eine andere Beschaffenheit der testikulären Spermien aufgrund ihres unterschiedlichen Reifegrades
2. die Anhaftung von Geweberesten, die zum Ausstreichen nicht vollständig ausgewaschen werden konnten und
3. eine höhere Schichtdicke im Vergleich zu einem Ejakulat-Ausstrich.

Letztendlich liegen im Hoden funktionell noch nicht voll ausgereifte Gameten vor, deren definitive Ausreifung erst im Nebenhoden stattfindet. Ob und wie sich dies auf die DNA-Fragmentationsrate auswirkt, muss durch zusätzliche Untersuchungen geklärt werden.

#### 4.1.5 Einfluss des pH-Wertes auf die DNA-Fragmentationsrate

Der Permeabilisationsschritt ist ein wichtiger Bestandteil der TUNEL-Methode, da die meisten DNA-Fluoreszenz-Farbstoffe die intakte Spermienmembran nicht passieren können. Ziel der Permeabilisierung ist es, die Membran porös zu machen ohne diese dabei vollständig zu zerstören. Daher zählt dieser Reaktionsschritt zu einer der kritischsten Etappen für den weiteren Erfolg der Methode (Johnson *et al.*, 1996). Bei einer stark sauren Permeabilisationslösung oder einer übermäßig langen Einwirkzeit könnte die DNA der Zellen hydrolysiert werden mit der Konsequenz einer verfälscht erhöhten DNA-Fragmentationsrate. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurden zwei Permeabilisationslösungen mit stark unterschiedlichen pH-Werten miteinander verglichen. Trotz eines pH-Unterschiedes von 5.2 ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der DNA-Fragmentationsrate (s. Abschnitt 3.4.1). Die dichte Verpackung innerhalb des Spermienkopfes könnte also die DNA bis zu einem gewissen Grad nicht nur vor oxidativem Stress, wie von Aitken & Baker (2006) beobachtet, sondern auch vor Säure schützen. Leider gibt es kaum Literaturquellen, die dies bestätigen. Diese Beobachtungen werfen zusätzlich Fragen bezüglich des Wirkmechanismus und der Zuverlässigkeit des SCSA-Tests auf, der im Unterschied zum TUNEL-Test auf einer *in situ*-Säuredenaturierung der DNA und dem Messen freier DNA-Enden und ihrer Suszeptibilität für AO-Moleküle beruht.

#### 4.1.6 Bewertung verschiedener Kontrollen des TUNEL-Tests

Beim TUNEL-Test katalysiert das Enzym TdT die Anheftung markierter Nukleotide an freie 3'-OH Enden der DNA. Läuft der Test richtig ab, so kann in einer Negativkontrolle, z.B. ohne Enzym-Zusatz, keine Fluoreszenz gemessen werden, unabhängig von der Höhe der DNA-Fragmentation. In der Literatur findet man zur Verwendung von Negativkontrollen jedoch keine Angaben. In der hier beschriebenen Untersuchung zeigte sich tatsächlich sehr oft keine Fluoreszenz, weshalb auf regelmäßige Negativkontrollen verzichtet wurde.

Tatsächlich liegt beim TUNEL-Test meist das umgekehrte Problem vor, nämlich die mangelnde Sensitivität in der Positiv-Kontrolle. Das wurde auch im Verlauf dieser Arbeit beobachtet, indem selbst nach sehr gründlicher DNase-Einwirkung (siehe oben) keinesfalls 100%ige DNA-Fragmentation erreicht wurde. Eine ungenügende Wirksamkeit der DNase lässt sich aufgrund des Versuchsaufbaus ausschließen. Prof. Dr. med. Uwe Paasch, Leipzig, berichtet aus seinem Labor von derselben Problematik (persönliche Mitteilung). Auch Mitchell *et al.* (2011) beobachteten, dass der TUNEL-Test die DNA-

Fragmentationsrate aufgrund der hohen Verpackungsdichte der DNA in Spermien durchgängig unterschätzt.

In dieser Studie wurde der Versuch unternommen, einen Zusammenhang zwischen der Höhe der nativen DNA-Fragmentationsrate und der in der Positivkontrolle erreichten Fragmentationsrate nachzuweisen. Eine Korrelation zwischen beiden Werten war aber nicht festzustellen (s. Tabelle 1). Zusätzlich zeigte sich eine hohe Variabilität in der Positivkontrolle. Es ist möglich, dass diese Variabilität durch einen unterschiedlich hohen Verpackungsgrad der DNA bedingt wird, oder Konsequenz ungeklärter Mechanismen ist, welche die DNA vor DNase-Verdau in der Positivkontrolle schützen.

#### **4.2 DNA-Fragmentation in testikulären Spermien?**

Greco *et al.* (2005) berichteten, dass die DNA-Fragmentationsrate in testikulären Spermien deutlich niedriger ist ( $4,8 \pm 3,6\%$ ) als in ejakulierten Spermien derselben Patienten ( $23,6 \pm 5,1\%$ ). Demnach könnten sich testikuläre Spermatozoen bezüglich der erzielten Schwangerschaftsraten um ein Vielfaches besser für ICSI eignen. Ein entsprechender Vergleich wurde auch im Rahmen dieser Studie versucht. Eine Bestätigung war aber aufgrund der Heterogenität der unterschiedlichen Proben leider nicht möglich. In den hier verwendeten Ausstrichen testikulärer Spermien waren neben einer Vielzahl von Artefakten zusätzlich Keimzellen unterschiedlicher Reifungsstadien vorzufinden, die das Ergebnis verfälschen konnten. Da TESE / ICSI jedoch eine Option für Männer mit hohen DNA-Fragmentationsraten darstellen könnte, wäre eine erneute Studie unter Einschluss der hier erarbeiteten methodischen Optimierungen erstrebenswert.

#### **4.3 Spermien-Selektion mit Hilfe der PICSI-Schale?**

Die positive Selektion von Spermien mit intakter DNA aufgrund ihrer Hyaluronat-bindenden Eigenschaften ist umstritten. In der hier vorgelegten Studie zeigten HA-bindende Spermien verglichen mit den nicht bindenden aber eine signifikant verringerte DNA-Fragmentation. Unsere Ergebnisse sprechen demnach überzeugend für den Einsatz der PICSI-Schale zur positiven Spermien-Selektion (s. Abschnitt 3.6, insbesondere Abb. 30). Hier wurde dabei erstmals das Augenmerk auf die DNA-Fragmentationsrate, und nicht „klassische“ Spermienparameter wie Motilität und Morphologie, gelegt. Um die in dieser Studie gemachten Beobachtungen in ihrer Aussagekraft zu stärken, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen mit größeren Fallzahlen.

Unbeantwortet bleibt die Frage nach nachfolgenden Effekten der durch die PICSI-Schalen selektionierten Spermien auf die Embryonenqualität, Abortrate, Schwangerschaftsrate etc.



---

In diesem Zusammenhang muss weiter überprüft werden, ob das Ergebnis von IVF und ICSI durch den Einsatz der PICSI-Schalen signifikant verbessert werden kann (Nijs et al. 2010).

#### 4.4 Schlussfolgerung

Durchflusszytometrie-basierte Verfahren gelten gegenwärtig als Goldstandart für unterschiedliche Untersuchungen an Zellen. Das gilt auch für Bestimmungen von DNA-Fragmentationsraten in Spermien mittels SCSA (Evenson *et al.*, 2002; Virro *et al.*, 2004). Ein entscheidender Nachteil der Methode ist, dass nicht die einzelnen Spermien im direkten Bild, sondern indirekte Parameter der Lichtstreuung beurteilt werden. Weiterhin muss das Probenvolumen relativ groß sein, und Gewebsverbände, z. B. Hodenbiopsien, können gar nicht untersucht werden. Außerdem sind Anschaffung und Unterhalt des Gerätes für kleine Labore teuer und verlangen evtl. zusätzliche personelle Ausstattung. Diese Defizite führten zu den oben beschriebenen Versuchen, Objektträger-basierte Verfahren der DNA-Fragmentationsmessung in Spermien zu optimieren, mit Schwerpunkt auf dem TUNEL-Test.

Objektträger-basierte Verfahren erlauben zwar nicht die hohen Messgeschwindigkeiten der Durchflusszytometrie, dafür können die Ergebnisse anhand der Koordinaten einzelnen Zellen zugeordnet werden. Die Existenz eines morphologischen Korrelats zu Messwerten ist besonders in klinischen Proben wichtig, vor allem wenn auf dieser Grundlage therapeutische Entscheidungen getroffen werden sollen. Außerdem gehen die Zellen, wenn sie einmal auf dem Objektträger immobilisiert wurden, nicht verloren, sondern stehen prinzipiell für weitere Messungen zur Verfügung. Die Objektträger können anschließend mit verschiedenen Färbungen behandelt und schließlich wie gewöhnliche Präparate gelagert werden.

Nach den entsprechenden methodischen Optimierungen stellt der Objektträger-basierte TUNEL-Test möglicherweise ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung der DNA-Fragmentation in Spermien in der andrologischen Klinik dar. Auch kann die Methode mit geeigneten Modifikationen vermutlich auf testikuläre Spermien übertragen werden. Es ergab sich jedoch eine Vielzahl von Hindernissen, die aufgrund von früheren Erfahrungen mit Gewebeschnitten nicht erwartet worden waren. Als ein Hauptproblem wurde eine ungleichmäßige Reaktion in verschiedenen Bereichen des Objektträgers ausgemacht, bedingt durch eine unterschiedlich hohe Flüssigkeitssäule. Dieses Problem ist in der Literatur bisher nur im Zusammenhang mit der Acridin Orange-Färbung beschrieben worden. Die metachromatische Färbung reagiert besonders empfindlich auf Verschiebungen der Mengenverhältnisse von interkalierendem Farbstoff und DNA.

Welche einzelnen Schritte oder Faktoren der TUNEL-Reaktion durch unterschiedliche Schichtdicken bzw. Flüssigkeitssäulen beeinflusst werden, bleibt zu klären.

Der TUNEL-Test misst direkt DNA-Doppelstrangbrüche und ist sowohl für das Lichtmikroskop als auch für das Fluoreszenzmikroskop sowie für Durchflusszytometrie-basierte Verfahren geeignet. Die Beobachtungen und Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen allerdings die Auffassung vieler Autoren, dass Ergebnisse aus Objektträger-basierten und durchflusszytometrischen Messungen nicht miteinander verglichen werden können.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine gemeinsame und verbesserte Grundlage für die Reproduzierbarkeit des TUNEL- und des SCSA-Tests zur Messung der DNA-Fragmentation in Spermien zu erarbeiten.

Folgende Parameter wurden untersucht:

- verschiedene Arten von Objektträgern
- Tesafilm auf dem Objektträger
- Fixativa, insbesondere Mikrowellen-Fixierung
- DNase-, Kollagenase-Einsatz, Permeabilisationslösungen 1 & 2
- PICSI-Schalen

Für eine genauere Beschreibung siehe Abb. 4.1.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Der lysinbeschichtete Menzel-Objektträger zeigte die beste Spermienhaftbarkeit ohne chemisches Fixativ.
- Der Einsatz von Tesafilm auf den Objektträgern zur Minimierung der Inhomogenität ergab im Vergleich zum normalen Objektträger ohne Einsatz von DNase keinen signifikanten Unterschied. Hingegen war er mit DNase signifikant.
- Die Mikrowelle fixierte bei 600 Watt und 15 Sek. über 90% der ausgestrichenen Ejakulat-Spermien, aber nicht der Spermien aus Hodenbiopsien; im getesteten Zeitrahmen von 15 und 45 Sek. Fixierungszeit hatte sie keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der DNA-Fragmentation. Sie zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der 4% PAF-Fixierung, war dieser aber in Kosten, Einfachheit und Schnelligkeit der Durchführung überlegen.
- Ein Vergleich von TUNEL-Test und SCSA-Test in Bezug auf die Untersuchung derselben Spermien war aufgrund von widersprüchlichen Farbergebnissen nicht möglich.
- Die Permeabilisationslösungen 1 und 2 ergaben im Vergleich trotz eines pH-Unterschiedes von 5,2 keine signifikanten Unterschiede mit und ohne DNase-Einsatz bezogen auf die DNA-Fragmentationsrate. Dagegen ergaben die variierten

Aziditätsgrade der Permeabilisationslösung 2 bei einer 10-fach höheren Säurekonzentration diesbezüglich eine Signifikanz.

- Der Gradienten-Aufbau auf dem Objektträger war zusätzlich zum eindeutigen optischen Unterschied bei den T-Tests von Abschnitt 1 zu 3 beider Permeabilisationslösungen signifikant. In dieser Arbeit wurde dieser Effekt als einer der größten Störfaktoren in der gesamten TUNEL-Reaktion betrachtet.
- Es wurden unterschiedliche Suszeptibilitäten der Spermien gegenüber DNase beobachtet. Ein Zusammenhang konnte hier nicht etabliert werden.
- Bei den Hodenbiopsien zeigte die Methode der „Aufkonzentrierung“, des „Waschschrittes“ und des „Siebeinsatzes“ gegenüber der Mikrowellen-Fixierung keine Unterschiede. Der Mittelwert aller Biopsie-Proben lag bei der Nativkontrolle bei 16,17% DNA-Fragmentationsrate und war damit genauso hoch wie bei den Ejakulaten (15%). Bei der Positivkontrolle lag der Mittelwert bei 46,59% und damit unter dem Wert der Ejakulate (77,02%).
- PICSI-Schalen binden Spermien mit einer deutlich reduzierten DNA-Fragmentationsrate im Vergleich zu den Normal-Ausstrichen.

### 5.1 Ausblick

Es bedarf umfangreicherer Studien zum Vergleich von unterschiedlichen Objektträgern und ihren Haftungs- bzw. Abstoßungseigenschaften aufgrund der Oberflächenladung.

Weiterhin muss der Versuch mit dem Flüssigkeitsgradienten / „Einfluss der Höhe der Flüssigkeitssäule“ eingehender geprüft werden, da Beobachtungen eindeutig für den Nutzen des Tesafilm-Einsatzes und der Abhängigkeit zwischen der Reagenzien-Höhe und der Höhe der messbaren DNA-Fragmentation sprechen. Hier bietet sich nun eine genaue Auswertung mittels AxioVision an.

Der TUNEL-Test kann nicht in einen direkten Vergleich mit SCSA-Test gesetzt werden. Ein Ansatzpunkt wäre die separate Aufbereitung des SCSA-Tests auf Objektträgern. Hierzu müsste aber zunächst das Problem der Auskristallisierung beseitigt werden (s. Abschnitt 3.1). Dennoch sprechen die Ergebnisse bezüglich der bedingten Ansprechbarkeit der DNA auf verschiedene Säure-Behandlungen gegen eine gleiche Aussagekraft der beiden Tests. Bevor sich diese Frage endgültig klären lässt, wäre für reproduktionsmedizinische Zentren und ihre Patienten derzeit eine Anwendung des TUNEL-Tests ratsam.

Ein interessanter Punkt für weitere Forschungsarbeiten sind die besonderen Schutzmechanismen der Spermien gegenüber unterschiedlichen Noxen, beispielsweise Säure oder elektromagnetische Wellen. Offensichtlich ist die Schwelle der Suszeptibilität

bei allen Proben individuell unterschiedlich hoch / niedrig und ist durch bestimmte unbekannte Faktoren initial festgelegt. Sollten sich diese spezifizieren lassen, so wäre ein breiterer Weg zu Behandlung infertiler Patienten geebnet.

Entgegen Ergebnissen anderer zeigte sich kein Unterschied in der DNA-Fragmentationsrate der Spermien aus Hoden und Ejakulaten (CAVE: unterschiedliche Patienten). Dies würde wiederum bedeuten, dass es sich hierbei um ein primär testikuläres Ereignis handelt. Um diese These zu verifizieren, ist ein fallzahlreicher Vergleich zwischen ejakulierten und testikulären Spermien mit den erarbeiteten Methoden erforderlich. Das Ergebnis wäre maßgeblich für den Sinn einer optionalen TESE-Prozedur bei Männern mit erhöhter DNA-Fragmentation im Ejakulat.

## 6 Summary

The aim of this thesis was to develop generally applicable and optimized protocols for improving the reproducibility of TUNEL and SCSA tests that are in use for measuring DNA fragmentation in human spermatozoa.

For this, the following parameters were examined:

- different types of slides
- adhesive tape on the slide
- different chemical fixatives as well as microwave-fixation
- DNase-/collagenase-digestion and different permeabilisation solutions (1 & 2)
- PICSI-dishes coated with hyaluronic acid

For a precise description see image 4.1.

The following results were achieved:

- The lysin-covered Menzel object slide displayed the best adhesive properties for spermatozoa without the use of chemical fixatives.
- The application of adhesive tape on the object slide for minimisation of staining inhomogeneity in comparison to the use of a standard object slide without application of DNase digestion showed no significant difference. Contrasting this, the results with DNase digestion were statistically significant.
- Microwave fixation at 600W and 15s time fixed over 90% of spermatozoa in the spreaded ejaculate, but spermatozoa derived from testicular biopsy failed to be fixed. In the tested time period of 15s to 45s fixation time no significant influence on the amount of DNA-fragmentation was encountered. The results of microwave fixation did not differ significantly from the 4% PAF-fixation, but it was shown to be cheaper, simpler and faster in its use.
- A comparison of results obtained from TUNEL and SCSA testing in respect to investigating the same spermatozoa (double staining) was not possible due to inconsistent staining.
- The permeabilisation solutions 1 & 2 showed, despite covering a pH-range of 5.2, no significant differences in respect to the amount of DNA-fragmentation in the presence or absence of DNase-digestion. However, increasing the acidity of

permeabilisation solution 2 by 10-fold resulted in significant differences in DNA-fragmentation.

- The induced gradient on the object slide resulted in a clear optical effect of different staining intensities as well as in a statistical difference for t-tests between sections 1 and 3 using both permeabilisation solutions. For this thesis, this observed effect was considered to be one of the biggest disruptive factors leading to irreproducible results in the TUNEL procedure.
- Different DNase susceptibilities of spermatozoa were observed for individual patients, but no molecular biological context for this phenomenon could be defined.
- For testicular biopsies, the methods of “enrichment”, “washing” and “filter sieve” showed no differences when compared to microwave fixation. The average DNA fragmentation of all biopsy samples was 16.17% for native controls and was thus similar to ejaculates (15%). For the positive control, 46.59% DNA fragmentation was found, which is considerably less than in ejaculates (77.02%).
- PICSI-dishes bind spermatozoa that exhibit significantly lower DNA fragmentation when compared to the same ejaculates on standard slides.

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Essigsäure
ART	<i>artificial reproduction technic</i>
AO	<i>Acridin Orange</i>
BF	<i>bright field</i>
bzw.	beziehungsweise
CA	Zitronensäure
DFI	DNA-Fragmentationsindex
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Deoxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
evtl.	eventuell
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluorescein Isothiocyanit
GF	Gesichtsfeld
HBA	<i>sperm-hyaluronan binding assay</i>
HCl	Salzsäure
HDS	<i>high DNA stainability cells</i>
i.d.R.	in der Regel
ICSI	Intacytoplasmatische Spermatozoeninjektion
IVF	<i>in-vitro</i> Fertilisation
IUI	intrauterine Insemination
mDF	<i>modified Davidson's Fluid</i>



Min.	Minute
PAF	Paraformaldehyd
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
ROS	<i>reaktive oxygen species</i>
s.	siehe
s.w.u.	siehe weiter unten
SCD	sperm chromatin dispersion test
SCSA	<i>Sperm-Chromatin-Structure-Assay</i>
SD	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
Sek.	Sekunde
TdT	Terminal Deoxynukleotidyl-Transferase
TESE	Testikuläre Spermatozoen-Extraktion
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Isothyocyanate</i>
TUNEL	<i>Terminal Deoxynukleotidyl-Transferase mediated dUTP nick-end labelling</i>
U	Umdrehung/-en
u.a.	und andere
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B.	zum Beispiel

## 8 Literaturverzeichnis

- Agarwal, A., Makker, K. & Sharma, R., 2007. REVIEW ARTICLE: Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59(1), pp.2–11.
- Aitken, R. & Baker, M., 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1-2), pp.66–69.
- Aitken, R.J., De Iuliiis, G.N. & McLachlan, R.I., 2009. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology*, 32(1), pp.46–56.
- Alvarez, J.G., 2005. The predictive value of sperm chromatin structure assay. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(8), pp.2365–2367.
- Angelopoulou, R., Plastira, K. & Msaouel, P., 2007. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5(1), p.36.
- Barroso, G., 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15(6), pp.1338–1344.
- Benchaib, M., 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 18(5), pp.1023–1028.
- Bonfoco, E., 2001. Characterization of a Novel Proapoptotic Caspase-2- and Caspase-9-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), pp.29242–29250.
- Chohan, K.R. et al., 2006. Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *J Androl*, 27(1), pp.53–59.
- D.P. Evenson et al., 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 14(4), pp.1039–1049.
- Darzynkiewicz, Z. et al., 1976. Cytofluorometric studies on conformation of nucleic acids in situ. II. Denaturation of deoxyribonucleic acid. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 24(1), pp.49–58.
- Darzynkiewicz, Zbigniew et al., 2011. Cytometry of DNA replication and RNA synthesis: Historical perspective and recent advances based on “click chemistry.” *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 79(5), pp.328–337.

- Duhnke, J.: *Analyse der DNA-Integrität von ejakulierten und testikulären Spermatozoen*. Univ. Diss., Fachbereich Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2011.
- Evenson, D P, Darzynkiewicz, Z & Melamed, M.R., 1980. Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry. *Chromosoma*, 78(2), pp.225–238.
- Evenson, Donald & Wixon, Regina, 2006. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Biomedicine Online*, 12(4), pp.466–472.
- Evenson, D. & Wixon, R., 2005. Comparison of the Halosperm® test kit with the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertility and Sterility*, 84(4), pp.846–849.
- Evenson, D.P., 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 14(4), pp.1039–1049.
- Evenson, Donald P, Larson, K.L. & Jost, Lorna K, 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, 23(1), pp.25–43.
- Gandini, L., 2004. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human Reproduction*, 19(6), pp.1409–1417.
- Gorczyca, Jianping Gong & Zbigniew Darzynkiewicz, 1993. Detection of DNA Strand Breaks in Individual Apoptotic Cells by the in Situ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Nick Translation Assays. Available at: <http://emedien.sub.uni-hamburg.de/han/9360/cancerres.aacrjournals.org/content/53/8/1945.abstract> [Accessed September 13, 2011].
- Greco, E. et al., 2005. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(1), pp.226–230.
- Hellman, B., Vaghef, H. & Boström, B., 1995. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, 336(2), pp.123–131.
- Huszar, Gabor et al., 2006. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18(3), pp.260–267.
- Huszar, Gabor et al., 2003. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and sterility*, 79 Suppl 3, pp.1616–1624.

- De Iuliis, G.N. et al., 2006. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(5), pp.1968–1975.
- J G Sun, A Jurisicova & R F Casper, 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Available at: <http://emedien.sub.uni-hamburg.de/han/2666/www.biolreprod.org/content/56/3/602.abstract> [Accessed September 13, 2011].
- Jakab, A et al., 2005. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertility and Sterility*, 84(6), pp.1665–1673.
- Johnson, J.A. et al., 1996. An Improved Permeabilization Protocol for the Introduction of Peptides Into Cardiac Myocytes: Application to Protein Kinase C Research. *Circulation Research*, 79(6), pp.1086 –1099.
- Ko, E., Rademaker, A. & Martin, R., 2001. Microwave decondensation and codenaturation: a new methodology to maximize FISH data from donors with very low concentrations of sperm. *Cytogenetics and cell genetics*, 95(3-4), pp.143–145.
- Kosower, N.S., Katayose, H. & Yanagimachi, R., 1992. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *Journal of andrology*, 13(4), pp.342–348.
- De Kretser, D.M. and Holstein, A.F. (1976) Testicular biopsy and abnormal germ cells. In Hafez, E.S.E (ed) *Human Semen and Fertility Regulation in Men*. Mosby, St. Louis, pp.332-343.
- Larson-Cook, K., 2003. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay,. *Fertility and Sterility*, 80(4), pp.895–902.
- Lin, M.-H. et al., 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. *Fertility and sterility*, 90(2), pp.352–359.
- Loo, D.T., 2011. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 682, pp.3–13.
- Marcon, L. & Boissonneault, G., 2003. Transient DNA Strand Breaks During Mouse and Human Spermiogenesis: New Insights in Stage Specificity and Link to Chromatin Remodeling. *Biology of Reproduction*, 70(4), pp.910–918.
- Martin, N.C. et al., 2006. The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. *Science & Justice*, 46(3), pp.179–184.

- Meseguer, M. et al., 2011. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility*, 95(1), pp.124–128.
- Meseguer, M. et al., 2009. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertility and sterility*, 92(5), pp.1638–1645.
- Mitchell, L.A., De Iuliis, G. N. & Aitken, R.J., 2011. 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*, 34(1), pp.2–13.
- Morris, I.D., 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 17(4), pp.990–998.
- Negoescu, A. et al., 1998. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie*, 52(6), pp.252–258.
- Negoescu, A. et al., 1996. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 44(9), pp.959–968.
- Nieschlag, E., Behre, H.M. & Nieschlag, S. eds., 2009. *Andrologie*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available at: <http://emedien.sub.uni-hamburg.de/han/SpringerEbooksUKE/www.springerlink.com/content/n501j2045m827386/> [Accessed January 11, 2011].
- Nijs, M. et al., 2010. Relationship between hyaluronic acid binding assay and outcome in ART: a pilot study. *Andrologia*, 42(5), pp.291–296.
- Ostermann, H., TheNext Step in Near Infrared Fluorescence: IRDye QC-1 Dark Quencher, 2009; Review Article.
- Paasch, U., Grunewald, S., & Glander, H. (2007). DNA-Schäden ejakulierter Spermatozoen: ein prädiktiver Faktor der männlichen Infertilität. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*, 4(3), 124.
- Paasch, U. et al., 2005. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 7(1), pp.61–69.
- Patterson, M.K. & Bulard, R., 1980. Fixation of cells in tissue culture by microwave irradiation. *Journal of Tissue Culture Methods*, 6(1), pp.1–3.
- Peng, X. et al., 2009. A nonfluorescent, broad-range quencher dye for Förster resonance energy transfer assays. *Analytical Biochemistry*, 388(2), pp.220–228.

- Razavi, S.H. et al., 2010. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. *Andrologia*, 42(1), pp.13–19.
- Reipert, S. et al., 2008. Rapid Microwave Fixation of Cell Monolayers Preserves Microtubule-associated Cell Structures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(7), pp.697–709.
- Rhee, S.G., 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental & Molecular Medicine*, 31(2), pp.53–59.
- Rhemrev, J.P.T. et al., 2001. Progressively motile human spermatozoa are well protected against in vitro lipid peroxidation imposed by induced oxidative stress. *Andrologia*, 33(3), pp.151–158.
- Sakkas, D, Mariethoz, E, Manicardi, G., et al., 1999. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of reproduction*, 4(1), pp.31–37.
- Sakkas, D, Mariethoz, E & St John, J.C., 1999. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Experimental cell research*, 251(2), pp.350–355.
- Sakkas, Denny et al., 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of reproduction*, 66(4), pp.1061–1067.
- Schmidt, R.F., 2007. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*, Springer.
- 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 reproduction (Oxford, England)*, 14 Suppl 1, pp.82–96.
- Singh, N.P. et al., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), pp.184–191.
- Singh, N.P. et al., 1989. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Experimental Cell Research*, 184(2), pp.461–470.
- Steger, K. et al., 2005. Effect of Vasectomy on Sperm Nuclear Chromatin Condensation in the Rabbit. *Journal of Andrology*, 26(2), pp.289–295.
- Tamburrino, L. et al., 2012. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian journal of andrology*, 14(1), pp.24–31.
- Tejada, R.I. et al., 1984. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertility and Sterility*, 42(1), pp.87–91.
- Tomsu, M., 2002. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Human Reproduction*, 17(7), pp.1856–1862.

- Yagci, A. et al., 2010. Spermatozoa Bound to Solid State Hyaluronic Acid Show Chromatin Structure With High DNA Chain Integrity: An Acridine Orange Fluorescence Study. *Journal of Andrology*, 31(6), pp.566–572.
- Virro, Michael R, Kjersten L Larson-Cook, and Donald P Evenson. “Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) Parameters Are Related to Fertilization, Blastocyst Development, and Ongoing Pregnancy in in Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles.” *Fertility and Sterility* 81, no. 5 (May 2004): 1289–1295. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.09.063.
- Zini, A, 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 75(4), pp.674–677.
- Zini, Armand, San Gabriel, M. & Libman, J., 2010. Lycopene supplementation in vitro can protect human sperm deoxyribonucleic acid from oxidative damage. *Fertility and Sterility*, 94(3), pp.1033–1036.
- Zini, Armand & Sigman, M., 2009. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of andrology*, 30(3), pp.219–229.

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Entstehung von DNA-Fragmentation durch ROS [aus Agarwal et al. American Journal of Reproductive Immunology 59 (2008) 2-11].....	4
Abb. 1.2: Funktionsweise des TUNEL-Tests [https://www.pharmatching.com/company/phoenix-flow-systems-inc]. .....	6
Abb. 1.3: Funktionsweise der flowcytometrischen Differenzierung von Spermien nach SCSA-Färbung [http://www.ohsu.edu/xd/health/services/women/services/fertility/fertility-services/lab-services/images/62.gif]. .....	7
Abb. 1.4: Prinzip der PICSI-Schale. Rot dargestellt ist ein HA-Mikrotropfen mit gebundenen Spermien. [http://www.abingtonreproductivemedicine.com/Websites/abington/images/PICSI.jpg]. ..	8
Abb. 2.1: Prinzip der Funktionsweise von HybriWell TM Hybridisierungs-kammern. A) Entfernung des Stickers von der Kammer B) Auflegen des Objektträgers auf die Hybridisierungskammer C) Einspritzen des Reagenz in die Kammer (MoBiTec Protokoll 2011). .....	23
Abb. 2.2: schematische Darstellung eines Objektträgers mit Deckgläschen über dem ungleichmäßigen Reagenzfilm (Seitenansicht). .....	24
Abb. 2.3: schematische Darstellung vom Objektträger mit Tesafilm (Seitenansicht). .....	24
Abb. 2.4: Aufbau des Flüssigkeitsgradienten unter dem Deckgläschen, vertikale Pfeile stellen die unterschiedlichen Reagenzhöhen dar (Seitenansicht). Der linke, mittlere und rechte senkrechte Pfeil entsprechen der höchsten, zweithöchsten und niedrigsten Reagenzhöhe.....	24
Abb. 2.5: Flowchart zum Ablauf der TUNEL-Reaktion. ....	25
Abb. 2.6: Skizze zum Ablauf der AO-Färbung. ....	26
Abb. 2.7: Schematischer Ablauf der SCSA- / AO-Färbung. ....	28
Abb. 2.8: Schematischer Aufbau der PICSI-Schale. Die Schale besitzt drei Hyaluronsäure-Mikrotropfen am Ende einer Linienmarkierung in der Schalenmitte, an der die Spermien aufgebracht werden. ....	29



Abb. 3.1: Fluoreszenzbild einer TUNEL-Positiv-Kontrolle, d.h. Reaktion nach DNase-Einsatz (links: Hellfeld 50 ms; rechts: FITC 2000 ms) bei 10-facher Vergrößerung. ....	31
Abb. 3.2: AO-gefärbtes Präparats im Hellfeld (oben: BF 50 ms), in der Grün-Fluoreszenz (links: FITC 200 ms) sowie in der Rot-Fluoreszenz (rechts: TRITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung. ....	32
Abb. 3.3: Überlappendes Fluoreszenzbild eines TUNEL- plus AO-gefärbten Präparats (grün: TUNEL mit FITC 2000 ms; rot: AO mit TRITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung. ....	32
Abb. 3.4: Fluoreszenzbild eines AO-gefärbten Präparats in zwei Kanälen (grün: FITC 200 ms; rot: TRITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung. ....	33
Abb. 3.5: Versetztes Fluoreszenzbild von TUNEL- plus AO-gefärbtem Präparat (TUNEL FITC 2000 ms gegen AO FITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung. ....	33
Abb. 3.6: Versetztes Fluoreszenzbild von TUNEL- und AO-gefärbtem Präparat (TUNEL FITC 2000 ms gegen AO TRITC 200 ms) bei 10-facher Vergrößerung. ....	33
Abb. 3.7: Spermienhaftung in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer (in Sek.) in Mikrowelle bei 600 Watt (10 Sek: $n=2$ ; 15 Sek: $n=11$ ; 20 Sek: $n=2$ ; 30 Sek: $n=3$ ; 45 Sek: $n=2$ ; 60 Sek: $n=3$ ) nach Simulationswaschgang. ....	36
Abb. 3.8: Vergleich von DNA-Fragmentationsraten bei 15 Sek. und 45 Sek. Mikrowellen-Fixierungszeit ( $n=2$ , Mittelwert+SD). ....	37
Abb. 3.9: Vergleich der DNA-Fragmentationsraten nach TUNEL-Reaktion auf Objektträgern mit und ohne Tesafilm-Einsatz sowie mit und ohne Turbo-DNase-Einsatz ( $n=4$ , Mittelwert+SD). ....	38
Abb. 3.10: Spannbreite des Zuwachses von DNA-Fragmentation nach TUNEL-Test mit Turbo-DNase-Einsatz auf Objektträgern mit und ohne Tesafilm-Applikation ( $n=8$ , Mittelwert+SD). ....	39
Abb. 3.11: Vergleich von DNA-Fragmentationsraten zwischen Mikrowellenfixierung und PAF 4%-Fixierung nach TUNEL-Reaktion ohne DNase-Einsatz ( $n=9$ , Mittelwert+SD). ....	40
Abb. 3.12: Vergleich von DNA-Fragmentationsraten zwischen Mikrowellenfixierung und PAF 4%-Fixierung nach TUNEL-Reaktion mit DNase-Einsatz ( $n=9$ , Mittelwert+SD). ...	40
Abb. 3.13: Vergleich zwischen Permeabilisationslösung 1 und 2 nach TUNEL-Test ohne / mit Turbo-DNase ( $n=4$ , Mittelwert+SD). ....	41
Abb. 3.14: Permeabilisationslösung 1 ohne Turbo-DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzmikroskopie) bei 10-facher Vergrößerung. ....	42

Abb. 3.15: Permeabilisationslösung 2 ohne Turbo-DNase-Einsatz (links BF-Bild; rechts: Fluoreszenzmikroskopie) bei 10-facher Vergrößerung. ....	42
Abb. 3.16: Permeabilisationslösung 1 mit Turbo-DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzmikroskopie) bei 10-facher Vergrößerung. ....	42
Abb. 3.17: Permeabilisationslösung 2 mit Turbo-DNase-Einsatz (BF-Bild; rechts: Fluoreszenzmikroskopie) bei 10-facher Vergrößerung. ....	42
Abb. 3.18: Einflusses des Aziditäts-Grades der Permeabilisationslösung 2 bei 0,02%, 0,1% und 0,2% Zitronensäure (CA) auf die Höhe der DNA-Fragmentationsrate ( $n=2$ , Mittelwert+SD). ....	43
Abb. 3.19: Zusammenhang zwischen der DNA-Fragmentationsrate und der Höhe der Reagenzsäule (1/4=hohe, 2/5=mittlere und 3/6=niedrige) auf dem Objektträger ( $n=4$ für Permeabilisationssolution 1, Mittelwert+SD; $n=7$ für Permeabilisationssolution 2, Mittelwert+SD). ....	44
Abb. 3.20: ausgestrichenes Ejakulat in Höhe der höchsten Flüssigkeitssäule (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild) bei 4-facher Vergrößerung. ....	45
Abb. 3.21: ausgestrichenes Ejakulat in Höhe der zweithöchsten Flüssigkeitssäule (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild) bei 4-facher Vergrößerung. ....	45
Abb. 3.22: ausgestrichenes Ejakulat in Höhe der mittleren Flüssigkeitssäule (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild) bei 4-facher Vergrößerung. ....	45
Abb. 3.23: ausgestrichenes Ejakulat in Höhe der niedrigsten Flüssigkeitssäule (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild) bei 4-facher Vergrößerung. ....	46
Abb. 3.24: Vergleich von nativen DNA-Fragmentationsraten nach TUNEL-Test (ohne DNase-Einsatz) mit den entsprechenden Positiv-Kontrollen derselben Probe (ausgestrichene Ejakulate, $n=16$ , Mittelwert+SD). ....	46
Abb. 3.25: DNA-Fragmentationsrate in Biopsien nach TUNEL-Test ohne / mit Turbo-DNase bezogen auf Spermien ( $n=6$ , Mittelwert + SD). Bei jeder Probe wurden pro Objektträger 200 Spermien ausgezählt. ....	48
Abb. 3.26: Vergleich zwischen DNA-Fragmentationsraten der an HA-Spots der PICSI-Schale gebundenen Spermien und den DNA-Fragmentationsraten von Ejakulatausstrichen (mikrowellenfixiert) nach TUNEL-Test ohne DNase-Einsatz ( $n=8$ , Mittelwert+SD). ....	50
Abb. 3.27: Vergleich zwischen DNA-Fragmentationsraten der an HA-Spots der PICSI-Schale gebundenen Spermien und den DNA-Fragmentationsraten von Ejakulatausstrichen,	

mikrowellenfixiert, nach TUNEL-Test mit Turbo-DNase-Einsatz ( $n=8$ , Mittelwert+SD). 50	
Abb. 3.28: HA-Mikrotropfen nach TUNEL-Test ohne DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild). .....	51
Abb. 3.29: Spermienausstrich desselben Patienten ohne DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild). .....	51
Abb. 3.30: HA-Mikrotropfen nach TUNEL-Test ohne DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild). .....	51
Abb. 3.31: Spermienausstrich desselben Patienten ohne DNase-Einsatz (links: BF-Bild; rechts: Fluoreszenzbild). .....	52
Abb. 4.1: Darstellung der wesentlichen Schritte des TUNEL-Tests (links auf den großen Kästchen) mit Angabe der veränderten Variablen des jeweiligen Schrittes ( <i>kursiv</i> ).....	53
Tabelle 1: native DNA-Fragmentationsraten [%] von Patient A bis P (grün: $\geq 10\%$ ; gelb: $\geq 15\%$ ; blau: $\geq 20\%$ ; rot: $\leq 20\%$ ) und ihr absoluter Anstieg [%] bzw. ihre absolute Anstiegsdifferenz [%] nach der Positivkontrolle. ....	47

---

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Wolfgang Schulze für seine Vergabe dieser interessanten Dissertationsstelle an mich bedanken. Vielen lieben Dank auch für die persönliche Unterstützung und Betreuung während dieser Zeit.

Einen großen Dank möchte ich auch an Dr. Andrej Spiess aussprechen, der mir nicht nur den Arbeitsplatz im andrologischen Institut zur Verfügung stellte, sondern mich auch intensiv im Prozess der Arbeit begleitete und unterstützte.

Des Weiteren möchte ich mich persönlich für die tolle Zusammenarbeit mit den medizinisch technischen Assistentinnen Christa Voeltzer und Gabi Hahn bedanken, die mich tatkräftig mit den benötigten Proben versorgten.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der andrologischen Abteilung Prof. Dr. Christiane Kirchhoff, Kathrin, Andrej und Heike für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein Dank geht an Campus Lehre UKE für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zum Fluoreszenzmikroskopieren, hier insbesondere an Claudia Lange, und an die Doktorandin Jennifer Duhnke, die sich Zeit genommen hatte, um mich in die Funktionsweise des Fluoreszenzmikroskops einzuführen.

Zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium und die Promotion an dieser Stelle ermöglichten, sondern mich dabei auch fortwährend unermüdlich seelisch und emotional unterstützten.

---

## **EIDESSTATLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiate überprüft werden kann.

Unterschrift.....