

Aus der Abteilung Humangenetik
(Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Engel)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

DNA-Strangbrüche in männlichen Keimzellen der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Neele Warntjen
aus Oldenburg

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Engel

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. sc. agr. H. W. Michelmann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ziele dieser Arbeit	5
2	Material und Methoden	6
2.1	Material	6
2.1.1	Chemikalien	6
2.1.2	Gebrauchswaren	7
2.1.3	Geräte	7
2.1.4	Puffer und Lösungen	8
2.1.5	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	9
2.1.6	Sterilisation	9
2.1.7	Mäuse- und Rattenstämme	9
2.1.8	Übrige Spezies	9
2.2	Methoden	11
2.2.1	Isolation von Spermien bei Maus und Ratte	11
2.2.2	Aufbereitung von Spermien	11
2.2.3	Chromomycin A3	12
2.2.4	Anilinblau	13
2.2.5	TUNEL-Assay (<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i> , modifiziert nach dem Protokoll des „ <i>In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein</i> “ von Roche®)	13
2.2.6	Acridinorange-Test	15
2.2.7	Untersuchung von apoptotischen Zellen im Hoden	16
2.2.8	Induktion von DNA-Brüchen	18
2.2.9	Statistische Auswertung	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Analyse von Wildtyp-Mäusen	19
3.1.1	Protaminierung in Wildtyp-Mäusen	19
3.1.2	DNA-Strangbrüche in Wildtyp-Mäusen	22
3.2	Veränderung der Apoptoserate, der Protaminierung und der DNA-Strangbrüche mit zunehmendem Alter	24
3.2.1	Identifikation von apoptotischen Keimzellen im Hoden	25
3.2.2	Protaminierung	26

3.2.3	DNA-Strangbrüche	28
3.3	Vergleich von Wildtyp- und Knockout-Mäusen	29
3.3.1	Protaminierung in Knockout-Mäusen	30
3.3.2	DNA-Strangbrüche in Knockout-Mäusen	33
3.4	Korrelationsanalysen	36
3.4.1	Korrelationsanalyse zwischen CMA3 und Anilinblau	36
3.4.2	Korrelationsanalyse zwischen TUNEL und AOT	37
3.4.3	Korrelationsanalyse zwischen DNA-Strangbrüchen und Protaminierung	38
3.4.4	Korrelationsanalyse zwischen DNA-Strangbrüchen, Protaminierung und weiteren Spermienparametern	39
3.5	Untersuchung von Pxt1-Knockout- Mäusen	40
3.5.1	Protaminierung	40
3.5.2	DNA-Strangbrüche	42
3.5.3	Induktion von DNA-Strangbrüchen	44
3.5.4	Analyse von apoptotischen Keimzellen	46
3.6	Untersuchung von verschiedenen Spezies	47
3.6.1	Protaminierung	48
3.6.2	DNA-Strangbrüche	50
4	Diskussion	52
4.1	DNA-Strangbrüche beim Menschen	53
4.2	DNA-Strangbrüche bei der Maus	55
4.3	Der Zusammenhang zwischen Fehlern in der Protaminierung und DNA-Strangbrüchen	56
4.4	Einfluss des Alters auf die DNA-Strangbrüche in den Spermien	57
4.5	Untersuchung von Pxt1 ^{-/-} -Mäusen	58
4.6	Suche nach einem geeigneten Tiermodell	59
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	64

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Negatives Spermium (Pfeilkopf) und positives Spermium (Pfeil), mit CMA3 gefärbt	12
Abb. 2	Negative und positive Spermien, mit Anilinblau gefärbt	13
Abb. 3	Beispiele für TUNEL-positive und TUNEL-negative Spermienköpfe	14
Abb. 4	Mit AO angefärbte Spermien	15
Abb. 5	Anzahl von CMA3-positiven Spermien bei Wildtyp-Mäusen, angegeben in %	20
Abb. 6	Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in Wildtyp-Mäusen, angegeben in %	21
Abb. 7	Anzahl von TUNEL-positiven Spermien bei Wildtyp-Mäusen, angegeben in %	23
Abb. 8	Anzahl von AOT-positiven Spermien bei Wildtyp-Mäusen, angegeben in %	24
Abb. 9	Mit DAB angefärbte Keimzellen	25
Abb. 10	Anzahl von apoptotischen Keimzellen pro Tubulus in den Testis junger und alter C57BL-Mäuse, gemessen mit Apoptag	26
Abb. 11	Anzahl von CMA3-positiven Spermien in jungen und in alten C57BL-Mäusen, angegeben in %	27
Abb. 12	Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in jungen und in alten C57BL-Mäusen, angegeben in %	28
Abb. 13	Anzahl von AOT-positiven Spermien in jungen und in alten C57BL-Mäusen, angegeben in %	29
Abb. 14	Schema der ausgeknockten Gene der in dieser Arbeit verwendeten Knockout-Mäuse	30
Abb. 15	Anzahl von CMA3-positiven Spermien in Mäusen von verschiedenen Knockout-Linien, angegeben in %	31
Abb. 16	Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in Mäusen von verschiedenen Knockout-Linien, angegeben in %	32
Abb. 17	Anzahl von TUNEL-positiven Spermien in Mäusen von verschiedenen Knockout-Linien, angegeben in %	34
Abb. 18	Anzahl von AOT-positiven Spermien in Mäusen von verschiedenen Knockout-Linien, angegeben in %	35

Abb. 19	Korrelationsanalyse zwischen den Ergebnissen des Grades der Protaminierung in verschiedenen Knockout-Mäusen, welche mit CMA3 und Anilinblau erfasst worden sind	37
Abb. 20	Korrelationsanalyse zwischen den Ergebnissen der Untersuchung der DNA-Strangbrüche in verschiedenen Knockout-Mäusen, welche mit TUNEL und Acridinorange erfasst worden sind	38
Abb. 21	Anzahl von CMA3-positiven Spermien in <i>Pxt1</i> ^{-/-} - und WT-Mäusen (129/Sv und C57BL), angegeben in %	41
Abb. 22	Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in <i>Pxt1</i> ^{-/-} - und WT-Mäusen (129/Sv und C57BL), angegeben in %	42
Abb. 23	Anzahl von TUNEL-positiven Spermien bei <i>Pxt1</i> ^{-/-} - und WT-Mäusen (129/Sv und C57BL), angegeben in %	43
Abb. 24	Anzahl von AOT-positiven Spermien bei <i>Pxt1</i> ^{-/-} - und WT-Mäusen (129/Sv und C57BL), angegeben in %	44
Abb. 25	Anzahl von TUNEL-positiven Spermien zu den Zeitpunkten 0 min, 5 min und 10 min nach der Inkubation mit DNase I in 129/Sv- und <i>Pxt1</i> ^{-/-} -Mäusen, angegeben in %	46
Abb. 26	Anzahl von apoptotischen Keimzellen pro Tubulus in den Testis von <i>Pxt1</i> ^{-/-} -und 129/Sv-Mäusen, gemessen mit Apoptag	47
Abb. 27	Anzahl von CMA3-positiven Spermien in verschiedenen Spezies, angegeben in %	48
Abb. 28	Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in verschiedenen Spezies, angegeben in %	49
Abb. 29	Anzahl von AOT-positiven Spermien in verschiedenen Spezies, angegeben in %	51
Tab. 1	Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für CMA3-positive Spermien in verschiedenen Wildtyp-Linien	20
Tab. 2	Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für CMA3-positive Spermien in verschiedenen Knockout-Linien	31
Tab. 3	Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für Anilinblau-positive Spermien in verschiedenen Knockout-Linien	33
Tab. 4	Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für TUNEL-positive Spermien in verschiedenen Knockout-Linien	34

Tab. 5	Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für AOT-positive Spermien in verschiedenen Knockout-Linien	35
Tab. 6	Korrelationsanalyse zwischen den DNA-Strangbrüchen und der Protaminierung	38
Tab. 7	Mittelwerte aller Linien und die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) der verschiedenen Parameter	39
Tab. 8	Korrelationsanalyse zwischen den verschiedenen Spermienparametern	39
Tab. 9	Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für CMA3-positive Spermien in verschiedenen Spezies	49
Tab. 10	Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für Anilinblau-positive Spermien in verschiedenen Spezies	50
Tab. 11	Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für AOT-positive Spermien in verschiedenen Spezies	51

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse
AOT	Acridinorange-Test
ART	<i>Assisted Reproductive Technology</i> , assistierte Reproduktionstechnik
bar	Einheit für den Druck
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBAVD	<i>Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens</i> , Angeborene zweiseitige Abwesenheit der Samenleiter
CMA3	Chromomycin A3
COMET	Comet Assay
CUAVD	<i>Congenital Unilateral Absence of the Vas Deferens</i> , Angeborene einseitige Abwesenheit der Samenleiter
d. h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasserstoffoxid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
l	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/l)
m-	milli-, (10 ⁻³)

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
μ-	mikro-, (10 ⁻⁶)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH- Wert (negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration)
<i>Pxt1</i>	<i>Peroxisomal Testis-specific Gen 1</i>
s.	siehe
SCO	<i>Sertoli Cell-Only syndrome</i>
sek	Sekunde
Sp.	Spermien
s. S.	siehe Seite
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TUNEL	<i>TdT-mediated-dUTP nick end labelling</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organization</i>
x	mal
x g	mal Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

Die ungewollte Kinderlosigkeit stellt ein häufiges Problem dar. Bei etwa 10-15 % der Paare mit Kinderwunsch hat sich nach einem Jahr noch keine Schwangerschaft eingestellt (Stauber 2007). Der Grund für die Infertilität liegt zu ungefähr 30 % beim Mann, zu 30 % bei der Frau, zu 20 % liegt der Grund bei beiden und zu etwa 20 % ist die Ursache unklar (Taubert und Licht 2007).

Die Ursachen für die männliche Infertilität sind vielfältig. Sie reichen von angeborenen Fehlbildungen, wie z. B. dem Kryptorchismus, über Varikozelen und Infektionen bis hin zum psychischen Stress (Esteves et al. 2011). In etwa 10-15 % der Fälle ist eine genetische Störung die Ursache für die Infertilität (Ferlin et al. 2007a, Krausz 2011). Als genetische Ursachen kommen unter anderem numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen, Mikrodeletionen und Mutationen in einzelnen Genen in Frage (O'Flynn O'Brien et al. 2010).

Eine der am häufigsten diagnostizierten numerischen Chromosomenaberrationen beim Mann ist mit ungefähr 1 auf 600 Geburten das Klinefelter-Syndrom (Bojesen et al. 2003), dessen Phänotyp im Jahr 1942 von Klinefelter beschrieben wurde (Klinefelter et al. 1942). Hierbei kann man zwischen zwei Formen unterscheiden: solchen ohne Mosaikbildung 47, XXY, die etwa 80 % der Fälle ausmachen – hierzu gehören auch die höhergradigen Aneuploidien – und solchen mit Mosaikbildung 47, XXY/ 46, XY (Lanfranco et al. 2004). Bei etwa 4 % der infertilen Männer und bei etwa 11 % der Männer mit einer Azoospermie wird ein Klinefelter-Syndrom gefunden (Van Assche et al. 1996). Bei diesem Syndrom kommt es bereits in der Fetalperiode zur Degeneration des Keimepithels, die sich mit zunehmendem Alter weiter verstärkt und letztendlich zur Infertilität führt (Wikström und Dunkel 2008).

Auch strukturelle Chromosomenaberrationen können zur Infertilität oder zu habituellen Aborten führen. Hierbei kann man zwischen der reziproken balancierten Translokation, der Inversion und der Robertsonschen Translokation unterscheiden. Insgesamt findet man bei infertilen Männern vier bis zehn Mal häufiger eine autosomale Translokation als bei fertilen Männern (Chandley et al. 1975, Elliott und Cooke 1997).

Bei der reziproken balancierten Translokation kommt es zu einem Austausch zweier, von unterschiedlichen Chromosomen stammenden Fragmente. Hierbei kommt es jedoch nicht zum Verlust von einzelnen Teilen des Chromosoms, so dass der Träger klinisch gesund ist. Die reziproke balancierte Translokation kann jedoch zu Subfertilität führen, da bei der meiotischen Teilung Gameten mit unvollständigem Chromosomensatz entstehen

können (Georgiou et al. 2006). Bei der häufig vorkommenden Robertsonschen Translokation kommt es zum Verschmelzen zweier akrozentrischer Chromosomen mit Verlust der kurzen Arme. Am häufigsten findet diese Translokation zwischen den Chromosomen 13 und 14 sowie 14 und 21 statt (Tariverdian und Buselmaier 2006). Man findet bei etwa 0,8 % der infertilen Männer eine Robertsonsche Translokation. Im Vergleich dazu konnte in einer Vielzahl von Neugeborenenstudien nur bei 0,085 % der Kohorten eine Robertsonsche Translokation nachgewiesen werden (De Braekeleer und Dao 1991). Die Auswirkungen dieser Translokation auf die Spermatogenese sind sehr unterschiedlich: z. T. findet man eine normale Spermatogenese, z. T. kommt es aber zur vollständigen Abwesenheit von Spermatogonien (Georgiou et al. 2006).

Bei etwa 5-10 % der infertilen Männer kann eine Mikrodeletion im langen Arm des Y-Chromosoms gefunden werden (Ferlin et al. 2007a). Bei Patienten mit einer nichtobstruktiven Azoospermie und einer Oligospermie liegt die Prävalenz der Mikrodeletionen sogar bei 15-20 % bzw. bei 7-10 % (Krausz et al. 2000). Am häufigsten findet man Mikrodeletionen bei Männern, die eine Spermienkonzentration von weniger als 2×10^6 Spermien/ml aufweisen (Ferlin et al. 2007b). In der betroffenen Region, die Azoospermie-Faktor-Region (AZF-Region) genannt wird (Tiepolo und Zuffardi 1976), liegen mehrere Gene, die für die normale Spermatogenese essentiell sind (O'Flynn O'Brien et al. 2010). Dazu gehören: das *USP9Y*-Gen (*ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked*) (Jones et al. 1996, Brown et al. 1998, Luddi et al. 2009), das *DBY/DDX3Y*-Gen (*DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked*) (Lahn und Page 1997), das *RBMY1A1*-Gen (*RNA binding motif protein, Y-linked, family 1 member A1*) (Ma et al. 1993, Chai et al. 1998), das *PRY*-Gen (*PTPN13-like, Y-linked*) (Lahn et Page 1997) sowie das *DAZ1*-Gen (*deleted in azoospermia 1*) (Reijo et al. 1995) und das *DAZ2*-Gen (*deleted in azoospermia 2*) (Saxena et al. 2000).

Insgesamt kann man diese Region in drei sich nicht überlappende Subregionen unterteilen, die sich in der Prävalenz der Mikrodeletionen und im klinischen Bild voneinander unterscheiden: eine proximale Region, AZFa, eine mittlere Region, AZFb und eine distale Region, AZFc (Vogt et al. 1996). Bei den infertilen Männern, bei denen man eine Yq11-Deletion festgestellt hat, findet man bei etwa 5 % eine Mikrodeletion in der AZFa-Region, bei etwa 16 % eine Deletion in der AZFb-Region, bei etwa 60 % und somit am häufigsten eine in der AZFc-Region. Gleichzeitige Mikrodeletionen in mehreren Regionen werden bei etwa 15 % der untersuchten infertilen Männer diagnostiziert (Cram et al. 2006). Untersucht man nun die Hoden der Patienten, so ergeben sich sehr unterschiedliche

Befunde: Bei Patienten mit AZFa-Deletion werden in den Hoden keine Spermatogonien und keine Spermien gefunden, lediglich Sertoli-Zellen (*Sertoli cell-only syndrom, SCO*). In den Hodenbiopsien von Patienten mit AZFb-Deletion werden nur Zellen gefunden, die sich in einem Arrest direkt vor oder während der Meiose befinden. Es können keine postmeiotischen Spermatiden gefunden werden. Hingegen findet man bei Patienten mit AZFc-Mikrodeletion ein sehr heterogenes Bild. Es reicht von der vollständigen Abwesenheit von Keimzellen bis hin zu einigen Spermatogonien und Spermatozyten (Vogt et al. 1996).

Wie bereits oben erwähnt, gibt es verschiedene Genmutationen, die zu einer Infertilität beim Mann führen können. Die in diesem Zusammenhang am häufigsten vorkommenden Mutationen gehören zum Krankheitsbild der zystischen Fibrose. Hierbei handelt es sich um eine rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, die eine Heterozygotenfrequenz von 1:25 besitzt (Strom et al. 2011). Das betroffene Gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) liegt auf dem Chromosom 7 (Rommens et al. 1989). Es gibt über 1000 verschiedene Mutationen dieses Gens (vergleiche „*The Cystic Fibrosis Mutation Database*“, 2010), die diese Krankheit auslösen können. Dabei ist die häufigste Ursache die Mutation p.F508del. Fast alle männlichen Patienten mit zystischer Fibrose sind infertil. Der Grund hierfür ist die mit dieser Mutation assoziierte kongenitale Aplasie der Vasa deferentia, die auf einer Seite (CUAVD, *Congenital Unilateral Absence of the Vas Deferens*) oder auf beiden Seiten (CBAVD, *Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens*) auftreten kann (Moskowitz et al. 2001/2008).

Des Weiteren sind etwa 450 verschiedene Gene bekannt, deren Mutation Einfluss auf die Spermatogenese und somit auf die männliche Fertilität hat. Die Beschreibung dieser Gene wurde in einem Review von Matzuk und Lamb 2008 zusammengefasst (Matzuk und Lamb 2008).

Bei einer Infertilitätsdiagnostik werden zunächst die Spermien der infertilen Männer auf Grundlage der WHO-Spermienparameter untersucht (WHO 2010). Die erhobenen Werte korrelieren zwar oft mit der Fertilität des Mannes, aber sie lassen keine eindeutige Aussage darüber zu, ob z. B. eine Infertilitätsbehandlung zum Erfolg, d. h. zu einer Schwangerschaft und einer Geburt führen wird oder nicht (Bonde et al. 1998, Guzick et al. 2001). Aus diesem Grund wird immer wieder nach neuen bzw. zusätzlichen Parametern gesucht, die die Diagnostik ergänzen bzw. präziser machen können (Giwerzman et al. 2010).

Ein relativ neuer Ansatz ist die Analyse der DNA-Strangbrüche in den Spermien. Deren Häufigkeit wird mittlerweile immer öfter in den Spermienproben von infertilen Männern

bestimmt. Der Anteil an Spermien mit DNA-Strangbrüchen liegt bei infertilen Männern durchschnittlich zwischen 20 % und 30 %, bei fertilen Männern zwischen 8 % und 19 % (Erenpreiss et al. 2008, Boxmeer et al. 2009, El-Melegy und Ali 2011, Pelliccione et al. 2011), wobei die Werte der Probanden in den jeweiligen Studien eine große Spannbreite aufweisen.

Für die Entstehung der DNA-Strangbrüche in Spermien – man kann hierbei zwischen Doppel- und Einzelstrangbrüchen unterscheiden – werden verschiedene Vorgänge verantwortlich gemacht:

Es kommen zum einen Fehler während der Protaminierung in Frage. Dies ist ein Prozess während der Spermatogenese, bei dem die DNA stärker kondensiert und die Histone durch Protamine, arginin- und cysteinreiche Proteine, ersetzt werden (Braun 2001). Somit ist die DNA auf dem Weg vom Testis bis zu den Oozyten kompakter und folglich effizienter vor äußeren Einflüssen geschützt (Oliva 2006). Im Zuge der Übertragung der DNA von den Histonen auf die Protamine entsteht die so genannte Torsionsspannung in der DNA. Um die Torsionsspannung zu beheben, wird die DNA von der Topoisomerase zerschnitten und im Normalfall wieder zusammengefügt. Hierbei können jedoch DNA-Brüche zurückbleiben (Leduc et al. 2008, Sakkas und Alvarez 2010). Des Weiteren kann eine ineffektive und unvollständige Apoptose von defekten oder überzähligen Keimzellen zu DNA-Strangbrüchen führen. Hierbei vollziehen die defekten Keimzellen nicht den programmierten Zelltod, sondern entwickeln sich weiter zu reifen Spermien, die DNA Strangbrüche aufweisen (Sakkas und Alvarez 2010). Zusätzlich gibt es noch eine Reihe von Oxidanzien (Reaktive Oxygen Species, ROS), welche Brüche in der DNA der Spermien verursachen können. Letztendlich können DNA-Strangbrüche durch eine Vielzahl von äußeren Einflüssen, wie z. B. Chemotherapeutika, Bestrahlung, Infektionen, verschiedene Chemikalien, etc. entstehen (Aitken und De Iuliis 2010, Sakkas und Alvarez 2010).

Es gibt fast 40 verschiedene Studien (Zini 2011) und Reviews, die DNA-Strangbrüche in Spermien im Zusammenhang mit der Fertilität des Mannes und dem Erfolg oder Nichterfolg von Infertilitätsbehandlungen untersuchen. Zum Teil weisen die Publikationen sehr widersprüchliche Ergebnisse auf (Zini 2011, Beshay und Bukulmez 2012). Es gibt einige, die zeigen, dass DNA-Strangbrüche im Zusammenhang mit der Fertilität des Mannes stehen und ein prädiktiver Faktor für den Ausgang einer Infertilitätsbehandlung sein können (Sergerie et al. 2005, Giwercman et al. 2010, Simon et al. 2010, Brahem et al. 2011a, Beshay und Bukulmez 2012, Erenpreiss et al. 2008). Es gibt auch welche, die hier keinen Einfluss

sehen (Høst et al 2000, Lin et al. 2008, Sadeghi et al. 2011, Thomson et al. 2011). Die endgültige Klärung dieser Frage steht also noch aus.

Um diese Fragestellung weiter zu bearbeiten, muss ein Tier-Modell gefunden werden, mit Hilfe dessen man die Problematik untersuchen kann. Hier setzt die vorliegende Arbeit an. Ziel der Untersuchung ist es zu klären, inwieweit sich die Maus als Modell eignet, um Zusammenhänge zwischen den DNA-Strangbrüchen und der männlichen Fertilität zu analysieren.

1.1 Ziele dieser Arbeit

1. Die Einführung von verschiedenen Methoden.
2. Die Analyse der DNA-Strangbrüche in den Spermienköpfen der Maus und der Vergleich der Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen Methoden gewonnen worden sind.
3. Die Untersuchung, inwieweit sich der Anteil an Spermien mit DNA-Strangbrüchen mit zunehmendem Alter verändert.
4. Die Analyse der Effektivität der Protaminierung in den Spermien von Mäusen aus verschiedenen Stämmen und Altersgruppen, um einen Zusammenhang zwischen dem Erfolg der Protaminierung und der Entstehung von Spermien mit DNA-Strangbrüchen zu untersuchen.
5. Die Analyse von DNA-Strangbrüchen in Spermien von multiplen Knockout-Maus-Linien, bei denen verschiedene Keimzell-spezifische Gene deletiert wurden.
6. Eine abschließende Beurteilung, ob die Maus ein geeignetes Modell ist, um Zusammenhänge zwischen dem Anteil an Spermien mit DNA-Strangbrüchen und der männlichen Fertilität zu untersuchen. Soweit dies zu verneinen ist, folgt die anschließende Suche nach einem besseren Tiermodell.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acridinorange	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Ammoniak	J.T. Barker, Deventer, Niederlande
Anilinblau	Riedel-de Haën, Seelze
Chromomycin A3	Sigma Aldrich, Deisenhofen
DNase I, <i>Amplification Grade</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen
DPBS	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Essigsäure	J.T. Barker, Deventer, Niederlande
Ethanol	J.T. Barker, Deventer, Niederlande
Eukitt® <i>quick hardening mounting medium</i>	Fluka Sigma Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd 50 %	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Roth, Karlsruhe
Immersionsöl	Zeiss, Göttingen
Isopropanol	J.T. Barker Deventer, Niederlande
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
Paraffin	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pikrin-Säure	Fluka Sigma Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
<i>Vectashield Mounting Medium (with DAPI)</i>	Linaris GmbH, Wertheim
Xylen	J.T. Barker, Deventer, Niederlande
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.1.2 Gebrauchswaren

Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Glaswaren	Schütt, Göttingen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger SuperFrost	Menzel-Gläser, Braunschweig
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Geräte

Autoklav	Biomedis Laborservice GmbH, Gießen
Zellcounter	Omnilab-Krannich GmbH, Göttingen
Histocentre 2 Einbettgerät	Shandon, Frankfurt a. M.
Fluoreszenzfilter	Olympus, München
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, München
Inkubator	W. Krannich GmbH+Co.KG, Göttingen
Lichtmikroskop	W.Krannich GmbH+Co.KG, Göttingen
Magnetrührer	Schütt Labortechnik, Göttingen
Mikrotom Jung RM 2035	Leica Instruments GmbH, Nussloch
pH-Meter	Sartorius, Göttingen
Rüttler	Schütt Labortechnik, Göttingen
Tischzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Vortexer	Schütt Labortechnik, Göttingen
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Schütt Labortechnik, Göttingen

2.1.4 Puffer und Lösungen

Gebrauchsfertige Anilinblau-Lösung	5 g Anilinblau in 100 ml PBS mit Eisessig auf pH 3,5 eingestellt
Gebrauchsfertige Acridinorange-Lösung	40 Teile 0,1 M Zitronensäure in ddH ₂ O 2,5 Teile 0,3 M Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O 10 Teile 1 % Acridinorange in ddH ₂ O pH 2,5
Gebrauchsfertige Lösungen für Apoptag®	
• <i>Working Strength TdT Enzyme</i>	7 Teile <i>Reaction Buffer</i> 3 Teile <i>TdT Enzyme</i>
• <i>Stop/Wash-Buffer</i>	1 Teil <i>Stop/Wash-Buffer</i> 34 Teile ddH ₂ O
• <i>Working Strength Peroxidase Substrate</i>	14,7 µl <i>DAB Dilution Buffer</i> 0,3 µl <i>DAB Substrate</i>
Bouin-Lösung	15 Teile filtrierte Pikrinsäure 5 Teile 37 % Formaldehyd 1 Teil Eisessig
Canyon-Lösung	1 Teil Eisessig 3 Teile Methanol
Gebrauchsfertige DNase I, 4U	4 µl DNase I 4 µl 10x Reaktionspuffer 32 µl Ampuwa
McIlvain-Puffer	1,647 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 0,353 ml 0,1 M Zitronensäure pH 7,0

TUNEL-Färbelösung	1 Teil <i>Enzyme Solution</i> 9 Teile <i>Label Solution</i>
-------------------	--

2.1.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis

Detection Kit

Millipore GmbH, Schwalbach

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.6 Sterilisation

Die Zitronensäurelösung und die Na₂HPO₄-Lösung wurden bei 121 °C und 1 bar Druck 10 min in einem Autoklaven sterilisiert. Die Anilinblau-Lösung wurde mit einem sterilen Filter (0,2 bis 0,45 µm Porengröße) filtriert.

Alle Plastikwaren wurden wie oben beschrieben autoklaviert. Die Glaswaren wurden für mindestens 2 h in einem Ofen bei 180 °C sterilisiert.

2.1.7 Mäuse- und Rattenstämme

Alle verwendeten Mäuse und Ratten stammten aus dem Tierstall des Institutes für Humangenetik, Göttingen. Sie wurden bei einem 12-h-Hell-Dunkel-Rhythmus und bei einer Temperatur von 21 °C ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % ± 5 % gehalten. Der Zugang zum Zuchtfutter (Mäuse) bzw. Haltungsfutter (Ratten) der Firma Sniff, Soest, und zu Leitungswasser war frei.

2.1.8 Übrige Spezies

Die übrigen in dieser Arbeit untersuchten Spermien der folgenden Spezies stammten aus den nachfolgend aufgeführten Einrichtungen:

Mensch

Arztpraxis Fr. Dr. med. M. Tobler,
Göttingen

Kaninchen

Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung,
Universitätsmedizin, Göttingen

Rhesusaffe	Primatenzentrum, Göttingen
Schaf	Department für Nutztierwissenschaften, Göttingen
Schwein	Tierärztliches Institut, Göttingen
Ziege	Department für Nutztierwissenschaften, Göttingen

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von Spermien bei Maus und Ratte

Die Mäuse wurden durch einen Genickbruch, die Ratten durch CO₂ getötet. Anschließend wurden die Nebenhoden frei präpariert und die Nebenhodenschwänze mit einem Teil des Ductus deferens herausgetrennt. Die Präparate wurden anschließend in eine auf einer Wärmeplatte stehende Petrischale mit 1 ml 37 °C warmer PBS-Lösung gelegt und mit einer Nadel perforiert. Danach konnten die Spermien etwa 10 min aus den Nebenhoden und den Ductus deferentes in die PBS-Lösung heraus schwimmen. Nachfolgend wurden die Präparate aus der Lösung entfernt und die PBS-Lösung mit den Spermien in einen E-Cup pipettiert. Anschließend wurde die Petrischale mit 500 µl PBS ausgespült und die Lösung mit den restlichen Spermien in den E-Cup gegeben. Die Spermien wurden anschließend bei -20 °C eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt zu untersuchen.

2.2.2 Aufbereitung von Spermien

Alle weiteren in dieser Arbeit untersuchten Spermien (ausgenommen die Spermien der Mäuse und der Ratten, s. o.) wurden durch Ejakulation gewonnen. Die Proben wurden anschließend mit PBS verdünnt und bei 2000 x g 10 min zentrifugiert. Als nächstes wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 2 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension erneut zentrifugiert. Die Spermien wurden so lange gewaschen und die oben genannten Schritte wiederholt, bis der Überstand klar war. Zum Schluss wurde das Pellet in PBS resuspendiert. Die Spermienkonzentration wurde so optimiert, dass unter dem Mikroskop bei einer 60fachen Vergrößerung etwa 10 Spermien sichtbar waren. Aus den Spermiesuspensionen wurden jeweils 50 µl Aliquots in E-Cups abpipettiert und diese bei -20 °C eingefroren.

Um die Spermien schließlich zu untersuchen, wurde die eingefrorene Spermiesuspension im E-Cup an der Luft wieder auf Raumtemperatur aufgetaut. Es wurden jeweils 20 µl der Spermiesuspension auf einen Objektträger aufgetragen. Als nächstes wurden die Spermien mit Hilfe der langen Seite einer Pipettenspitze gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt und an der Luft getrocknet.

2.2.3 Chromomycin A3

Es kann untersucht werden, ob die Protaminierung der DNA in den Spermien erfolgreich abgelaufen ist. Hierfür wird der Farbstoff Chromomycin A3 (CMA3) verwendet, der von *Streptomyces griseus* stammt und sich an die Guanin-Cytosin-Paare der DNA bindet. Da an dieser Stelle auch die Protamine binden, konkurriert der Farbstoff mit diesen um die gemeinsame Bindungsstelle. Bindet sich CMA3 an die DNA, leuchten die Spermien unter dem Fluoreszenzmikroskop hellgelb, wenn CMA3 sich nicht an die DNA binden kann und somit Protamine vorhanden sind, erscheinen die Spermien dunkelgelb (Abb. 1).

Am Anfang wurden je 50 µl der aufgetauten Spermiesuspension in ein E-Cup gegeben und 10 min bei 2000 x g zentrifugiert, bis sich ein deutlich sichtbares Pellet gebildet hatte. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in einer 4 °C kalten 1 : 3-Eisessig-Methanol-Mischung resuspendiert und 5 min bei 4 °C in einem Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden 20 µl der Suspension auf einen Objektträger aufgetragen und getrocknet. Danach wurden die Spermien mit 100 µl 0,25 mg/ml CMA3 (in McIlvain-Puffer, pH 7,0, mit 10 mM MgCl₂), abgedeckt mit einem Deckglas, 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Objektträger 3 x 2 min in McIlvain-Puffer, pH 7,0, gewaschen und mit 20 µl 50 % Glycerol in PBS und einem Deckglas abgedeckt.

Die Objektträger wurden danach sofort bei 60facher Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Filter mit einer Wellenlänge von 450-490 nm ausgewertet. Es wurden jeweils 2 x 200 Spermien ausgezählt. Hierbei wurden die schwach gelb leuchtenden Spermien als negativ und die hellgelb leuchtenden Spermien als positiv gewertet (Abb. 1).

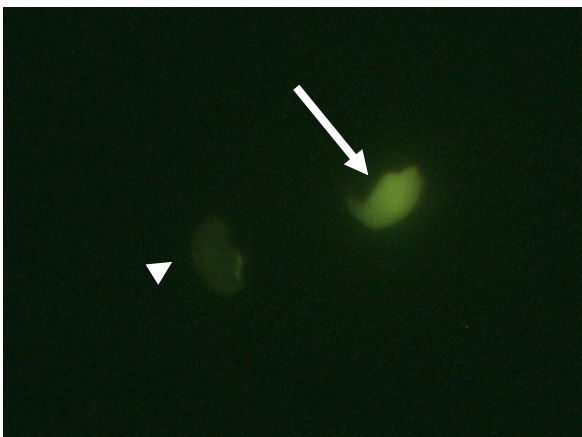


Abbildung 1 Negatives Spermium (Pfeilkopf) und positives Spermium (Pfeil), mit CMA3 gefärbt.

2.2.4 Anilinblau

Auch bei diesem Versuch wird der Grad der Protaminierung analysiert. Hierfür wird untersucht, ob noch Histone an die DNA gebunden oder ob diese schon durch Protamine ausgetauscht worden sind. Dazu wird der saure Farbstoff Anilinblau verwendet. Dieser färbt die lysinreichen Histone blau an. Somit erscheinen Spermien, deren DNA noch an Histone gebunden ist, dunkelblau, solche, die bereits an Protamin gebunden sind, hellblau (Abb. 2).

Die ausgestrichenen Spermien wurden 30 min in 3 % Glutaraldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Danach ließ man die Objektträger trocknen. Weiter wurden die Objektträger 7 min in Anilinblau in einer Küvette bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x 2 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Eukitt® und einem Deckglas abgedeckt. Die fertigen Objektträger wurden bei 100facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop begutachtet. Es wurden jeweils 2 x 200 Spermien ausgewertet. Als negativ wurden die hellblau gefärbten Spermien betrachtet und als positiv die blau bis dunkelblau gefärbten Spermien (Abb. 2).

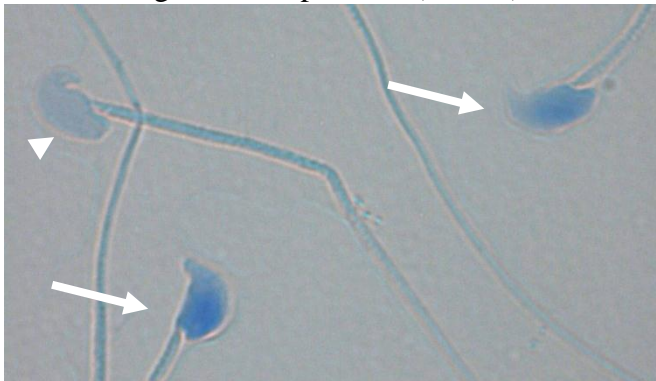


Abbildung 2 Negative (Pfeilspitze) und positive (Pfeil) Spermien, mit Anilinblau gefärbt.

2.2.5 TUNEL-Assay (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*, modifiziert nach dem Protokoll des „*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*“ von Roche®)

Mit dieser Methode kann man sowohl DNA-Doppel- als auch DNA-Einzelstrangbrüche in Spermien nachweisen. Dafür wird mit Hilfe des Enzyms Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) ein Fluoreszenzfarbstoff, Fluorescein-dUTP, mit den durch die Brüche entstandenen freien 3'OH-Enden verknüpft.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die folgenden Inkubationsschritte jeweils bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer und mit einem Deckglas abgedeckt durchgeführt. Gewaschen wurden die Spermien auf dem Objektträger jeweils in einer Glasküvette.

Zu Beginn wurden auf die ausgestrichenen Spermien pro Objektträger 100 μ l 4 %iges Paraformaldehyd (PFA) aufgetragen, um die Spermien anschließend 30 min hiermit zu inkubieren. Danach wurden die Objektträger 3 x 5 min in PBS gewaschen und wieder an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Spermien mit 20 μ l/ml Proteinase K für 15 min permeabilisiert. Wieder wurden die Objektträger 3 x 5 min in PBS gewaschen und getrocknet. Als nächstes wurden die Objektträger für die Positiv- und die Negativkontrolle 10 min mit 4 U (Units) DNase I inkubiert und anschließend 3 x 5 min in PBS gewaschen. Die übrigen Objektträger lagerten in dieser Zeit in der feuchten Kammer. Danach wurden alle Objektträger, die Negativkontrolle ausgenommen, mit 15 μ l der fertigen TUNEL-Lösung 1 h im Dunkeln in einer vorgewärmten feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle wurde stattdessen mit 15 μ l *Label Solution* bei gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger im Dunkeln 3 x 5 min in PBS gewaschen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgeklopft. Zum Schluss wurden die Spermien mit *Vectashield* mit DAPI, 2:1 verdünnt mit H₂O, abgedeckt und mit einem Deckglas und Nagellack verschlossen.

Beurteilt wurden die Spermien bei einer 60fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem FITC-Filter. Es wurden jeweils etwa 200 Spermien ausgewertet, wobei stark leuchtende Spermien als positiv, schwach oder wenig leuchtende Spermien als negativ gewertet wurden (Abb. 3). Es wurden nur solche Durchgänge beurteilt, in denen die Positivkontrolle positiv und die Negativkontrolle negativ war.

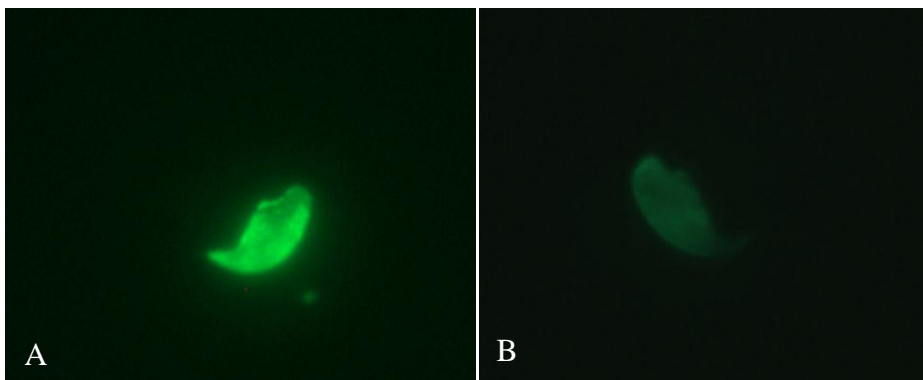


Abbildung 3 Beispiele für TUNEL-positive (A) und TUNEL-negative (B) Spermienköpfe.

2.2.6 Acridinorange-Test

Mit diesem Test kann man nur Einzelstrangbrüche nachweisen. Man untersucht, ob die DNA intakt ist, also keine DNA-Einzelstrangbrüche vorhanden sind, oder ob sie defekt ist und somit DNA-Einzelstrangbrüche aufweist.

Hierzu werden die Spermien mit Acridinorange (AO) angefärbt. Es handelt sich hierbei um einen Farbstoff, der sich an die DNA anlagert. Bindet er an einzelsträngige DNA, leuchten die Spermien rot, orange oder gelb, lagert er sich jedoch an doppelsträngige DNA an, leuchten die Spermien grün. Die Färbung der Spermien mit einzelsträngiger DNA (rot, orange oder gelb) ist davon abhängig, wie viel einzelsträngige DNA vorhanden ist (je mehr einzelsträngige DNA, desto mehr geht die Färbung der Spermien ins Rote).

Für den Versuch wurden die Spermien auf den Objektträgern über Nacht in kalter, frischer Canyon-Lösung bei 4 °C fixiert. Danach wurden sie an der Luft getrocknet und anschließend mit 50 µl frischer AO-Lösung 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur, abgedeckt durch ein Deckglas, gefärbt. Anschließend wurden sie 3 x 2 min in ddH₂O gewaschen. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas abgedeckt und sofort bei 60facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem Filter mit einer Wellenlänge von 450-490 nm ausgewertet. Es wurden jeweils 400 Spermien ausgezählt. Hierbei wurden die grünen Spermien als negativ und die gelben, orangen und roten Spermien als positiv gewertet (Abb. 4).

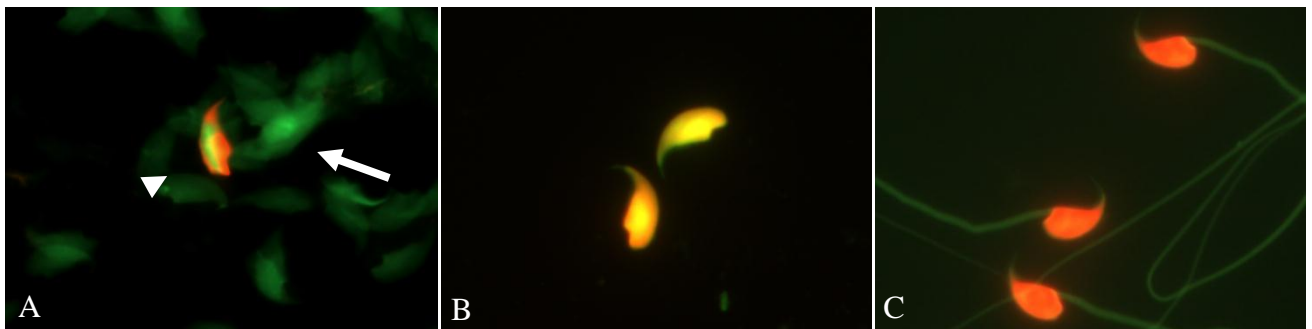


Abbildung 4 Mit AO angefärbte Spermien. (A) Spermien ohne DNA-Brüche färben sich grün (Pfeil), Spermien mit DNA-Brüchen färben sich orange-gelb (Pfeilkopf). (B) Orange-Gelb gefärbte Spermien mit DNA-Brüchen. (C) Rot gefärbte Spermien mit vielen DNA-Brüchen.

2.2.7 Untersuchung von apoptotischen Zellen im Hoden

2.2.7.1 Isolation und Fixation von Hodengewebe

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die folgenden Fixationsschritte auf einem Rüttler und bei Raumtemperatur vollzogen:

Die Mäuse wurden wie oben beschrieben (s. 2.2.1, S. 11) getötet und danach die Hoden der Mäuse entnommen. Die isolierten Hoden wurden über Nacht in Bouin-Lösung fixiert. Danach wurden sie je 1 x 15 min in 70 % EtOH, 3 x 20 min in 80 % EtOH, 4 x 20 min in 90 % EtOH, 4 x 20 min in 96 % EtOH und anschließend 5 x 20 min in 100 % EtOH fixiert. Zusätzlich wurde bei 70 %, 80 %, 90 % und 96 % EtOH je ein Tropfen Ammoniak zum Entfärben dazu gegeben. Danach wurden die Hoden über Nacht in 100 % Isopropanol fixiert. Anschließend wurden die Proben je 30 min in 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 Isopropanol : Xylol gegeben. Weiter wurden die Hoden über Nacht in 100 % Xylol gelegt. Danach wurden sie bei 60 °C in einem Inkubator für mehrere Tage in flüssigem Paraffin gelagert.

2.2.7.2 Schneiden

Die in Paraffin gelagerten Hoden wurden mit Hilfe des Shandon Histocentre 2 in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die erkalteten Paraffinblöcke mit dem Mikrotom in 6 µm dünne Schichten geschnitten, auf SuperFrost Objektträger aufgetragen und getrocknet.

2.2.7.3 Apoptag (nach der Anleitung für das „ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit“ von Millipore)

Mit dieser Methode kann man DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche in Zellen, die im Rahmen der Apoptose entstanden sind, nachweisen. In den durchgeführten Experimenten sollten die apoptotischen Keimzellen im Hoden dargestellt werden.

Um die in Apoptose gegangenen Zellen darzustellen, werden die hierbei entstandenen freien 3'OH-Enden der DNA markiert. Dazu wird in einem ersten Schritt mit Hilfe des Enzyms Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit Digoxigenin (DIG) gekoppelte Nukleotidtriphosphate an die 3'OH-Enden gebunden. In einem zweiten Schritt werden an das DIG Antikörper angelagert, die wiederum mit Peroxidase gekoppelt sind. Zuletzt gibt man das Peroxidase Substrat Diaminobenzidin (DAB) dazu, so dass eine Farbreaktion an den

apoptotischen Zellen abläuft. Somit werden die Apoptosen unter dem Lichtmikroskop durch eine dunkelbraune Färbung sichtbar gemacht.

Die folgenden Schritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schnitte durften während der Prozedur nicht austrocknen.

Die Paraffinschnitte wurden jeweils 3 x 5 min in 100 % Xylol, 2 x 5 min in 100 % EtOH, 1 x 3 min in 95 % EtOH, 1 x 3 min in 70 % EtOH und anschließend 1 x 5 min in PBS inkubiert und somit entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte 15 min in einer Küvette mit 140 µl einer 10 mg/ml konzentrierten Proteinase K in 70 ml PBS inkubiert. Danach wurden sie 2 x 5 min in ddH₂O gewaschen. Als nächstes wurde die endogene Peroxidase mit Hilfe von H₂O₂ gehemmt. Dazu wurden die Objektträger 5 min in 3 % H₂O₂ in PBS inkubiert. Folgend wurden die Objektträger 2 x 5 min in PBS gewaschen. Die überschüssige Flüssigkeit ließ man ablaufen. Die verbliebene Flüssigkeit wurde vorsichtig um die einzelnen Präparate herum abgetupft. Sofort wurden pro Schnitt 13 µl Äquilibriumspuffer aufgetragen und für mindestens 10 sek inkubiert. Wieder wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgetupft und anschließend 11 µl *Working Strength TdT Enzyme* auf jedes Präparat aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte 1 h in einer vorgewärmten feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte 15 sek in 70 ml *Stop/Wash-Buffer* bewegt, um anschließend weitere 10 min darin zu inkubieren. Während dessen wurde das *Anti-Digoxigenin-Konjugat* aufgetaut. Pro Präparat wurden 13 µl entnommen und auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Schnitte wurden 3 x 1 min in PBS gewaschen. Die überschüssige Flüssigkeit ließ man ablaufen und trocknete vorsichtig den Objektträger um die Schnitte herum ab. Es wurden pro Schnitt jeweils 13 µl *Anti-Digoxigenin-Konjugat* aufgetragen und 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 4 x 2 min in PBS gewaschen. Währenddessen wurde das *Working Strength Peroxidase Substrate* angesetzt. Die Objektträger wurden um die Präparate herum getrocknet und pro Schnitt 15 µl *Working Strength Peroxidase Substrate* aufgetragen. Die Schnitte wurden 6 min gefärbt. Danach wurden sie 3 x 1 min in ddH₂O gewaschen und noch mal 5 min in ddH₂O inkubiert. Zuletzt ließ man das Wasser abtropfen und deckte die Präparate mit Eukitt® und einem Deckglas ab. Anschließend wurden sie bei 10facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop ausgewertet. Dabei wurden die dunkelbraun gefärbten Zellen als positiv gewertet (Abb. 9, s. S. 25).

2.2.8 Induktion von DNA-Brüchen

Die Spermien wurden wie unter 2.2.5 (TUNEL-Assay, s. S.13) beschrieben isoliert, ausgestrichen und fixiert. Nachdem die Spermien gewaschen und getrocknet waren, wurde je ein Objektträger mit Spermien 0 min, 5 min bzw. 10 min mit 4 U DNase I in einer feuchten Kammer, abgedeckt mit einem Deckglas, bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 3 x 5 min in PBS gewaschen und wie oben erwähnt gefärbt, gewaschen und schließlich mit DAPI eingedeckt.

Es wurden jeweils 200 Spermien bei 60facher Vergrößerung unter dem Mikroskop beurteilt, wobei auch hier nur Durchgänge gewertet wurden, in denen die Negativkontrolle negativ und die induzierten Spermien positiv waren.

2.2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm „STATISTICA 9.1.“ von StatSoft, Inc, Tulsa, USA, verwendet. Die Daten wurden entweder nach den jeweiligen Gruppen oder nach dem entsprechenden Zeitpunkt gepoolt. Ob die Daten normalverteilt waren, wurde mit der Shapiro-Wilk Analyse untersucht. Die Daten, die jeweils ein Verhältnis darstellten (in %), wurden winkeltransformiert.

Um signifikante Unterschiede zwischen den normalverteilten oder winkeltransformierten Gruppen nachzuweisen, wurde für zwei Gruppen der t-Test, für mehr als zwei Gruppen die Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) und anschließend die Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für ungleich große Proben verwendet. Dabei gibt ANOVA an, ob zwischen den Gruppen insgesamt signifikante Unterschiede vorhanden sind. Die Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse zeigt hingegen auf, zwischen welchen Gruppen genau dieser Unterschied besteht. Für nicht normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Um den Zusammenhang zwischen verschiedenen Werten zu überprüfen, wurde eine Pearson-r-Korrelation bei Normalverteilung durchgeführt.

Alle Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von Wildtyp-Mäusen

3.1.1 Protaminierung in Wildtyp-Mäusen

Die Protaminierung ist ein physiologischer Vorgang während der Spermiogenese. Hierbei wird die DNA über mehrere Zwischenschritte von den Histonen auf die Protamine umgelagert und somit stärker kondensiert (Braun 2001, Castillo et al. 2010). Diese verstärkte Kondensation schützt die DNA vor Einflüssen von außen - unter anderem vor DNA-Strangbrüchen. Man kann also vermuten, dass, wenn die Protaminierung vollständig abläuft, weniger DNA-Strangbrüche entstehen.

In dieser Arbeit sollte in einem ersten Schritt untersucht werden, ob die Protaminierung in Spermien von Wildtyp-Mäusen vollständig abgelaufen ist. Zur Analyse wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: Chromomycin A3 (CMA3) und Anilinblau. Beide Methoden untersuchen den Grad der Protaminierung, wobei CMA3 die Abwesenheit der Protamine in Spermien anzeigt und Anilinblau die noch verbliebenen Histone markiert. Wurden in den folgenden Experimenten positive Spermien gefunden, bedeutete dies, dass die Protaminierung in diesen Zellen nicht vollständig stattgefunden hat.

3.1.1.1 CMA3

Zur Analyse der Protaminierung der DNA in den Spermien der Wildtyp-Linien 129/Sv, C57BL, CD1 und FVB wurden jeweils drei biologische Replikate verwendet. Die Mäuse waren in einem Alter zwischen zwei und acht Monaten. Nachdem die Mäuse abgetötet worden waren, wurden die Nebenhoden herauspräpariert und die Spermien durch Perforation derselben in PBS isoliert. Die Spermien wurden anschließend zentrifugiert, um sie vom PBS zu trennen, und in einem weiteren Schritt mit Methanol und Eisessig fixiert und schließlich auf einen Objektträger aufgetragen. Pro Maus wurde je ein Objektträger angefertigt. Anschließend wurden die Spermien mit CMA3 angefärbt.

Es wurden für jede Maus 2 x 200 Spermien ausgezählt und bewertet. Als negativ wurden schwach gelb leuchtende Spermien, als positiv hellgelb angefärbte Spermien gewertet.

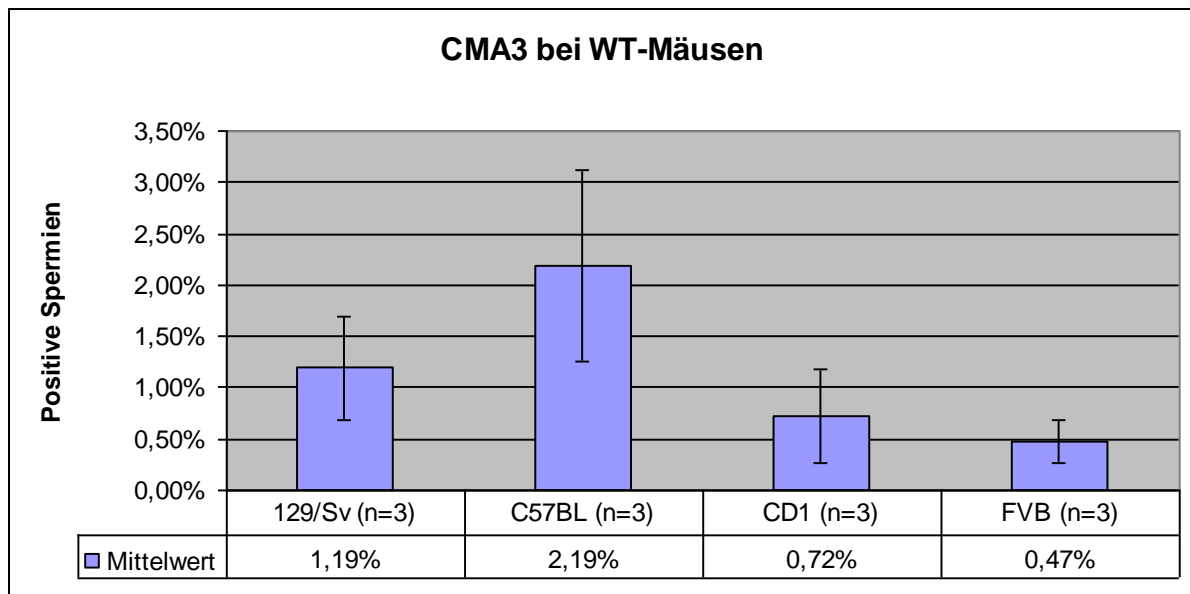


Abbildung 5 Anzahl von CMA3-positiven Spermien bei Wildtyp-Mäusen, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Es wird erkennbar, dass die Häufigkeit der Spermien mit fehlerhafter Protaminierung bei allen getesteten Wildtyp-Mäusen im Durchschnitt unter 2,19 % liegt. Die Ergebnisse (Abb. 5) haben eine Spannweite von 0,47 % \pm 0,21 % bis 2,19 % \pm 0,93 %. Um zu prüfen, ob zwischen den Ergebnissen ein signifikanter Unterschied besteht, wurden die Ergebnisse in einem ersten Schritt winkeltransformiert. In einem zweiten Schritt wurde eine ANOVA-Varianzanalyse durchgeführt. Da diese ein $F = 10,58$ und ein $p = 0,004$ anzeigte, wurde als nächstes eine Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse durchgeführt.

	129/Sv	C57BL	CD1	FVB
129/Sv		0,12	0,39	0,11
C57BL	0,12		0,012	0,004
CD1	0,39	0,012		0,77
FVB	0,11	0,004	0,77	

Tabelle 1 Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für CMA3-positive Spermien in verschiedenen Wildtyp-Linien. Die rot markierten Werte stellen einen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Linien ($p < 0,05$) dar.

Diese zeigt (Tab. 1), dass die C57BL-Mäuse signifikant mehr Spermien aufweisen, in denen die Protaminierung unvollständig abgelaufen ist, als die CD1- ($p = 0,012$) und die FVB-Mäuse ($p = 0,004$). Die übrigen Stämme unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

3.1.1.2 Anilinblau

Um die Effektivität der Protaminierung mit einer zweiten Methode zu prüfen, wurden die Spermien der Mäuse zusätzlich mit Anilinblau untersucht. Es wurden Mäuse derselben Stämme wie bei CMA3 verwendet. Pro Stamm wurden drei bis vier Tiere im Alter von zwei bis zehn Monaten analysiert.

Nachdem die Mäuse getötet worden waren, wurden die Nebenhoden herauspräpariert und die Spermien in PBS isoliert. Anschließend wurde pro Maus ein Objektträger mit der Spermien suspension bestrichen und getrocknet. Die Spermien wurden dann mit Glutaraldehyd fixiert und schließlich mit Anilinblau gefärbt. Es wurden jeweils 2 x 200 Spermien beurteilt. Als negativ wurden hellblau gefärbte Spermien, als positiv blau bis dunkelblau gefärbte Spermien bewertet.

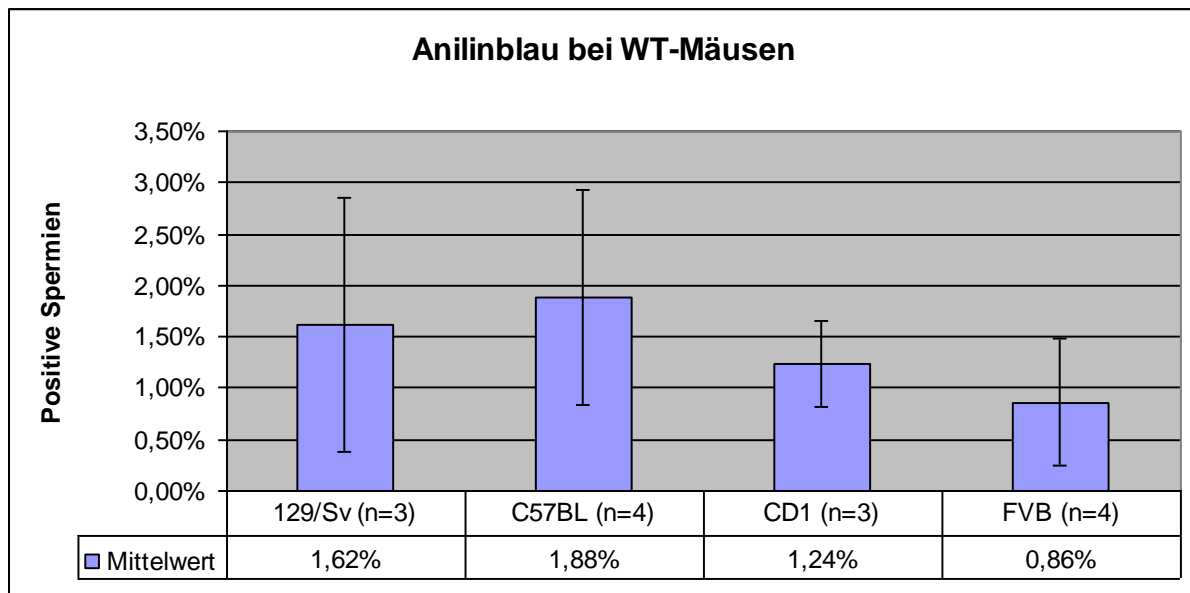


Abbildung 6 Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in Wildtyp-Mäusen, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Aus den Ergebnissen (Abb. 6) wird ersichtlich, dass die Fehlerrate in der Protaminierung bei dieser Analyse im Durchschnitt unter 1,88 % liegt und eine Spannweite von 0,86 % \pm 0,62 % bis 1,88 % \pm 1,05 % aufweist. Des Weiteren wurde eine statistische Auswertung gemacht. Hierfür wurden die Ergebnisse winkeltransformiert und in einem nächsten Schritt mit ANOVA untersucht. Diese zeigte mit einem $F = 1,17$ und einem $p = 0,37$, dass sich die Ergebnisse und somit die einzelnen Wildtyp-Linien in Bezug auf den Grad der Protaminierung mit dieser Methode nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.1.2 DNA-Strangbrüche in Wildtyp-Mäusen

In den bisherigen Ergebnissen spiegelt sich wieder, dass die Protaminierung in den Wildtyp-Mäusen fast vollständig abläuft, was daran ersichtlich wird, dass weniger als 2 - 3 % der Spermien eine unvollständige Protaminierung aufweisen. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, wie hoch die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen bei den oben genannten Mäusen der verschiedenen Mäusestämme ist (129S/v, C57BL, CD1 und FVB). Zur Beurteilung der DNA-Strangbrüche in Wildtyp-Mäusen wurden zwei verschiedene Methoden benutzt, zum einen „*TDT-mediated-dUTP nick end labeling*“ (TUNEL) und zum anderen der Acridinorange-Test (AOT). Diese unterscheiden sich in der Hinsicht, dass TUNEL sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektieren kann, wohingegen der AOT nur Einzelstrangbrüche sichtbar macht.

3.1.2.1 TUNEL

Zur Analyse mit TUNEL wurden Tiere der oben genannten Maus-Linien verwendet. Es wurden pro Linie jeweils drei bis vier Individuen im Alter zwischen vier und elf Monaten untersucht. Es wurde pro Maus ein Objektträger mit Spermien bestrichen und dieser getrocknet. Die Spermien wurden anschließend mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert, der Zellkern der Spermien mit Proteinase K permeabilisiert und anschließend die DNA-Strangbrüche mit TUNEL angefärbt.

Es wurden jeweils 200 Spermien analysiert. Als negativ wurden schwach grün leuchtende oder gar nicht gefärbte Spermien bewertet, als positiv intensiv grün leuchtende Spermien.

Wurden keine positiven Spermien gefunden, wurden weitere 200 Spermien ausgewertet. Es wurden nur solche Durchgänge in der Wertung berücksichtigt, bei denen die Positivkontrolle, mit DNase I induzierte DNA-Strangbrüche in Spermien, positiv war. Zusätzlich musste die Negativkontrolle, mit DNase I induzierte DNA-Strangbrüche in Spermien, die zwar ohne Enzym, jedoch mit Substrat, inkubiert worden sind, negativ sein.

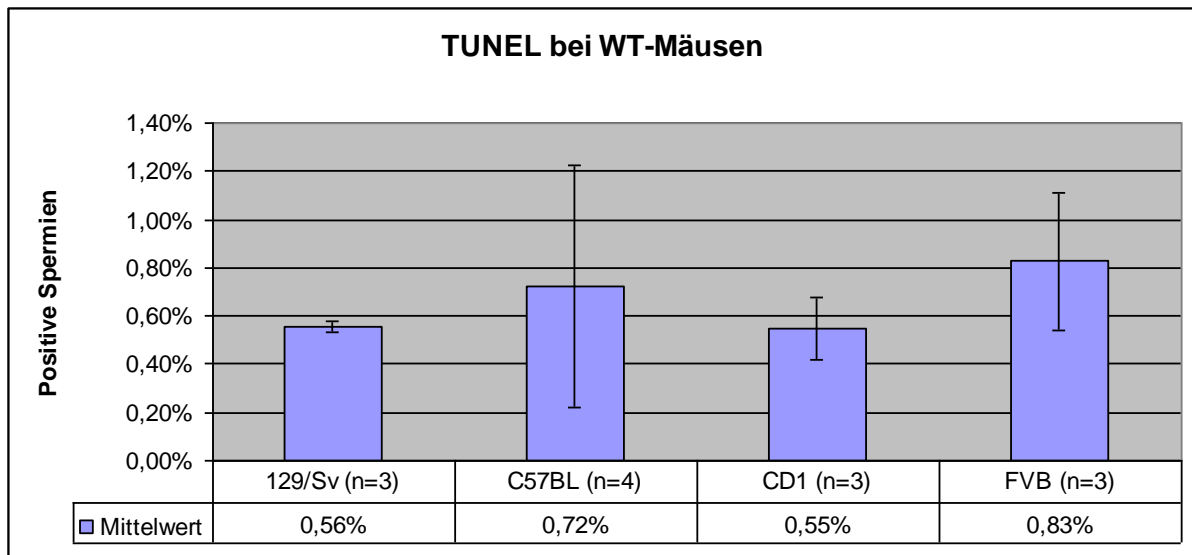


Abbildung 7 Anzahl von TUNEL-positiven Spermien bei Wildtyp-Mäusen, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Es wird erkennbar, dass die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen im Durchschnitt unter 0,83 % liegt und die Mittelwerte eine Spannbreite von 0,55 % \pm 0,13 % bis 0,83 % \pm 0,29 % aufweisen (Abb. 7). Des Weiteren wurde eine statistische Analyse durchgeführt. Auch hier wurden die Werte zuerst winkeltransformiert. Anschließend wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Mit einem $F = 0,550$ und einem $p = 0,661$ zeigte diese Analyse, dass sich die Spermien der Mäuse hinsichtlich der DNA-Strangbrüche nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.1.2.2 AOT

Zusätzlich wurden die Spermien mit Acridinorange angefärbt, um die oben ermittelten Ergebnisse zu überprüfen und speziell die Einzelstrangbrüche in der DNA zu untersuchen.

Es wurden weitere Mäuse der oben erwähnten Wildtyp-Linien analysiert. Pro Linie wurden drei bis vier Mäuse untersucht, welche zwischen zwei und zehn Monate alt waren.

Die Mäuse wurden abgetötet, die Nebenhoden entnommen und die Spermien in PBS isoliert. Diese wurden anschließend auf einen Objektträger aufgetragen und getrocknet. Pro Maus wurde je ein Objektträger angefertigt. Die Spermien wurden über Nacht in Methanol und Eisessig fixiert und anschließend mit Acridinorange gefärbt. Es wurden jeweils 400 Spermien gezählt und beurteilt. Als negativ wurden grüne, als positiv gelbe, orange und rote Spermien bewertet.

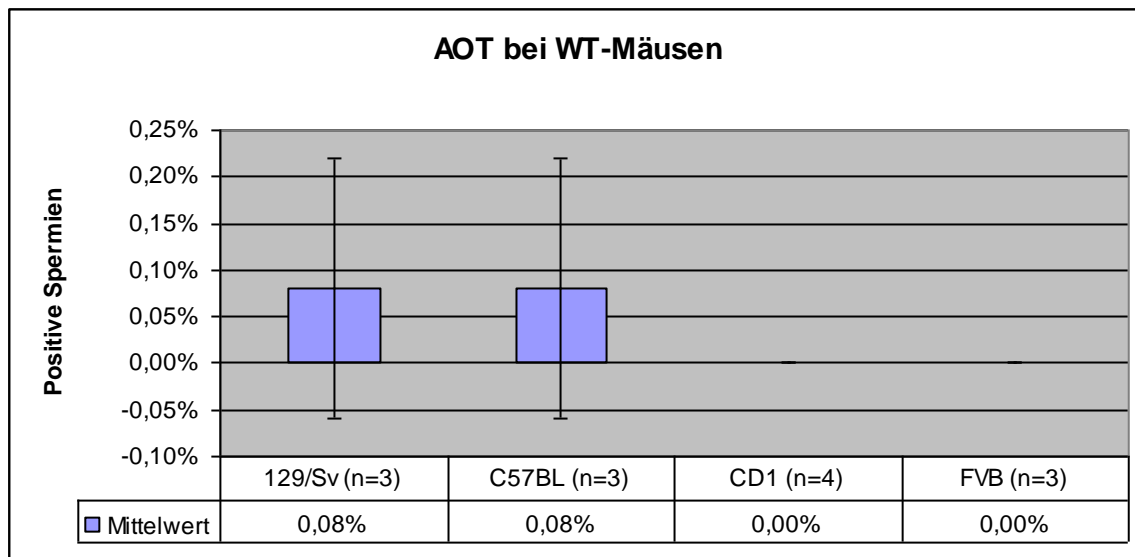


Abbildung 8 Anzahl von AOT-positiven Spermien bei Wildtyp-Mäusen, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Aus den Ergebnissen (Abb. 8) wird ersichtlich, dass die Wildtyp-Mäuse eine Varianz von 0,00 % bis zu 0,08 % \pm 0,14 % positive Spermien, d. h. Spermien mit DNA-Strangbrüchen, aufweisen. Wieder wurde eine statistische Auswertung durchgeführt. Die Werte wurden winkeltransformiert und anschließend mit einer Varianzanalyse untersucht. Diese zeigte mit einem $F = 0,808$ und einem $p = 0,520$, dass sich die Spermien der Mäuse bezüglich der DNA-Strangbrüche nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Insgesamt zeigte die Analyse der DNA-Strangbrüche mit beiden Methoden, dass die Zahl der DNA-Strangbrüche in den verschiedenen Wildtyp-Mäusen sehr gering ist. Die Analyse der Protaminierung zeigte außerdem, dass die Fehlerrate in der Protaminierung in diesen Mäusen sehr niedrig ist. Des Weiteren wurde ersichtlich, dass sich die einzelnen Ergebnisse, die mit den verschiedenen Methoden ermittelt worden sind, abgesehen von CMA3, nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.2 Veränderung der Apoptoserate, der Protaminierung und der DNA-Strangbrüche mit zunehmendem Alter

Wie aus den oben dargestellten Ergebnissen ersichtlich, ist sowohl die Anzahl der Spermien mit einer unvollständigen Protaminierung als auch die mit DNA-Strangbrüchen bei Wildtyp-Mäusen gering. Die zunächst untersuchten Mäuse waren relativ jung. Es stellte sich nun die Frage, ob eine deutliche Zunahme der Spermien mit DNA-Strangbrüchen und Fehler in der

Protaminierung erkennbar ist, wenn die Mäuse älter sind. Zu diesem Zweck wurde zunächst untersucht, wie es sich mit der Anzahl von apoptotischen Keimzellen in den Hoden junger (drei Monate) und älterer (dreizehn Monate) C57BL-Männchen verhält. Anschließend wurde die Effektivität der Protaminierung und die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen in dreizehn Monate alten C57BL-Männchen untersucht. Verglichen wurden die gewonnenen Ergebnisse mit denen von zwei bis vier Monate alten C57BL-Männchen.

3.2.1 Identifikation von apoptotischen Keimzellen im Hoden

Es sollte die Frage beantwortet werden, wie sich die Anzahl von apoptotischen Zellen mit dem Alter entwickelt (bei der Apoptose von Keimzellen handelt es sich um einen physiologischen Vorgang während der Spermatogenese (Kim et al. 2002)), um weitere Untersuchungen darauf aufzubauen.

Für diesen Versuch wurden jeweils drei dreizehn Monate alte und drei drei Monate alte C57BL-Männchen untersucht und miteinander verglichen. Die Mäuse wurden abgetötet und beide Hoden isoliert. Diese wurden über Nacht in Bouin-Lösung inkubiert und anschließend über mehrere Zwischenschritte mit EtOH, Isopropanol und Xylol entwässert und fixiert. Weiter wurden die Hoden in Paraffin eingebettet, in 6 µm dünne Schnitte geschnitten und auf einen Objektträger aufgetragen. Pro Maus wurden mehrere Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem ersten Schritt entparaffiniert und die Zellen mit Hilfe der Proteinase K permeabilisiert. Als nächstes wurden mit DIG gekoppelte Nukleotidtriphosphate mit Hilfe des Enzyms Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) an die durch die Apoptose entstandenen freien 3'OH-Enden gebunden. In einem zweiten Schritt wurden an das DIG Antikörper angelagert, die mit Peroxidase gekoppelt waren. Hieran lagerte sich in einem letzten Schritt das Diaminobenzidin (DAB) an, welches die apoptotischen Zellen letztendlich sichtbar macht. Unter dem Lichtmikroskop wurden die positiven Zellen pro angeschnittenen Tubulus ausgewertet (Abb. 9).

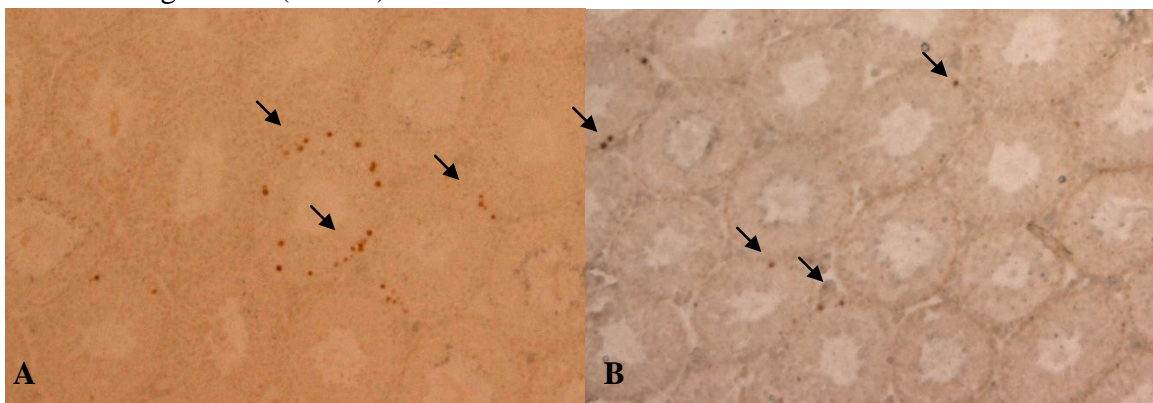


Abbildung 9 Mit DAB angefärbte Keimzellen (Pfeile). (A) Tubuli im Hoden eines jungen C57BL-Männchens. (B) Tubuli im Hoden eines alten C57BL-Männchens.

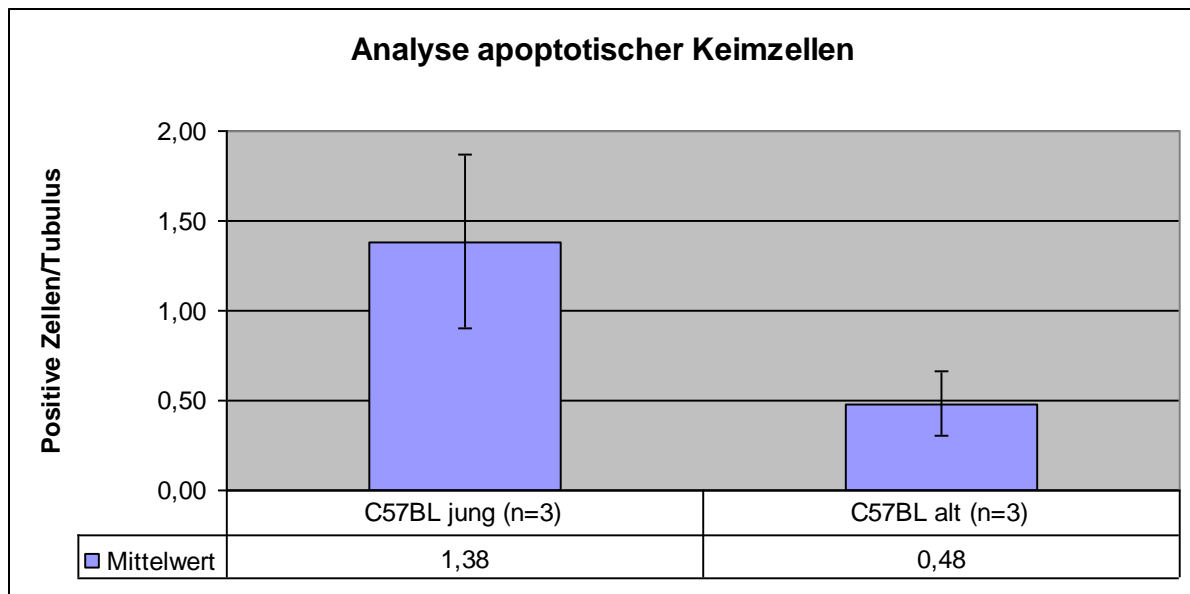


Abbildung 10 Anzahl von apoptotischen Keimzellen pro angeschnittenen Tubulus in den Testis junger und alter C57BL-Mäuse, gemessen mit Apoptag. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Ergebnisse (Abb. 10) zeigen, dass die Anzahl von apoptotischen Zellen in den Tubuli der untersuchten jungen Männchen bei $1,38 \pm 0,48$ liegt, die in den alten Männchen bei $0,48 \pm 0,18$. Diese Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet. Zunächst wurde mit der Shapiro-Wilk Analyse untersucht, ob die Ergebnisse normalverteilt sind. Diese ergab mit einem $p = 0,004$, dass dies nicht der Fall ist. Aus diesem Grund wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, der das nicht-parametrische Äquivalent zum t-Test ist. Dieser zeigte mit einem $p = 0,000014$, dass die alten C57BL-Männchen signifikant weniger apoptotische Keimzellen in ihren Hoden aufweisen als die jungen Männchen.

3.2.2 Protaminierung

Nachdem gezeigt worden war, dass sich die alten von den jungen C57BL-Männchen in der Anzahl von apoptotischen Keimzellen in den Hoden signifikant voneinander unterscheiden, sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, wie es sich mit dem Grad der Protaminierung verhält. Es ist zu vermuten, dass Keimzellen alter Männchen, die eine unvollständige Protaminierung aufweisen, durch eine unzureichende Apoptose nicht degenerieren, sondern sich zu reifen Spermien entwickeln.

3.2.2.1 CMA3

Der Versuch wurde wie oben beschrieben (3.1.1.1, s. S. 19) durchgeführt. Es wurden sechs 13 Monate alte C57BL-Männchen untersucht und mit drei zwei bis vier Monate alten C57BL-Männchen verglichen.

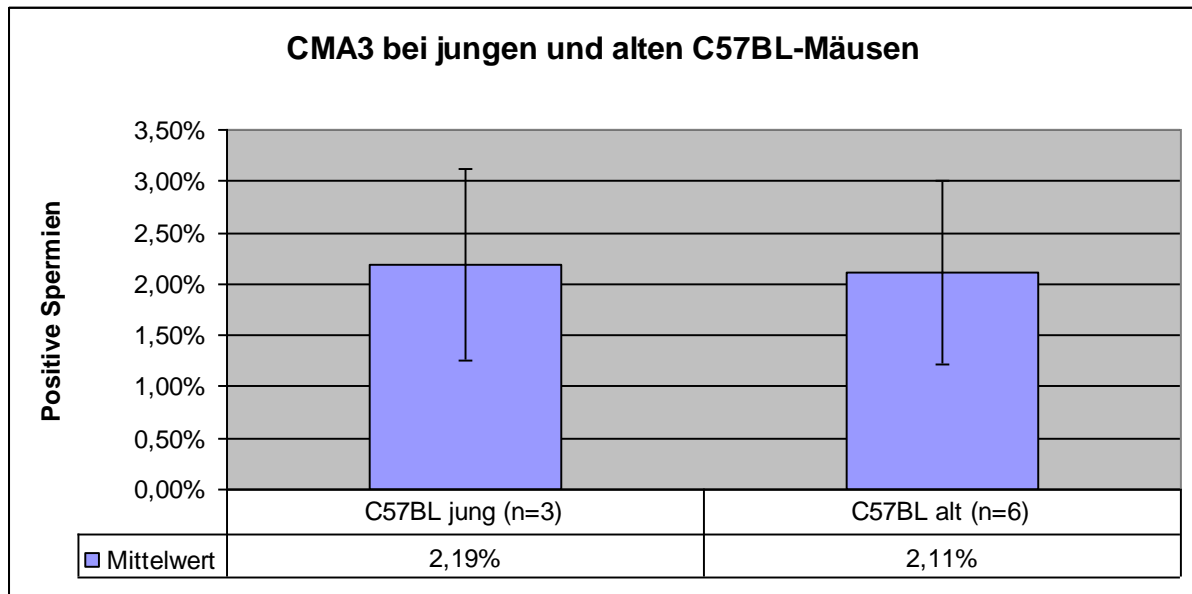


Abbildung 11 Anzahl von CMA3-positiven Spermien in jungen und in alten C57BL-Mäusen, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Aus den Daten (Abb. 11) wird ersichtlich, dass die Anzahl von Spermien mit einer fehlerhaften Protaminierung bei den jungen Mäusen bei $2,19\% \pm 0,93\%$ und bei den alten Mäusen bei $2,11\% \pm 0,89\%$ liegt. Die Ergebnisse wurden zunächst winkeltransformiert und anschließend wurde ein t-Test durchgeführt. Dieser ergab mit einem $p = 0,749$, dass sich die Spermien der jungen und der alten Mäuse hinsichtlich der Protaminierung nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.2.2.2 Anilinblau

Ergänzend wurden die Spermien der Mäuse mit Anilinblau untersucht. Auch hier wurden sechs biologische Replikate alter C57BL-Mäuse analysiert und mit vier biologischen Replikaten junger C57BL-Mäuse verglichen. Der Versuch und die Auswertung wurden wie oben beschrieben (3.1.1.2, s. S. 21) durchgeführt.

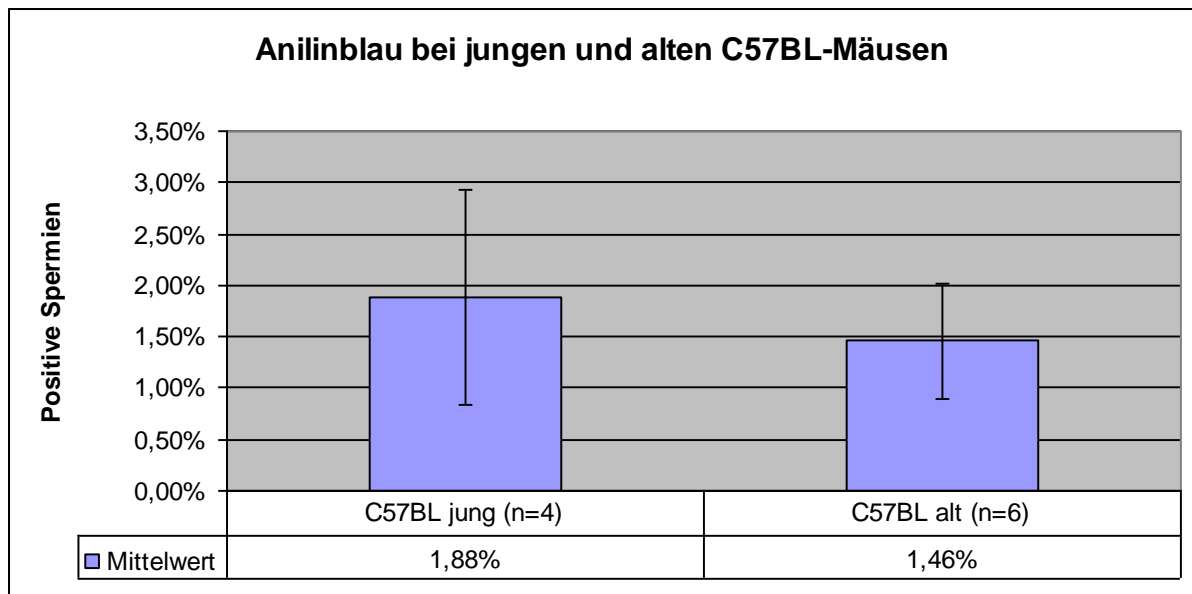


Abbildung 12 Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in jungen und in alten C57BL-Mäusen, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Auswertung der Ergebnisse (Abb. 12) zeigt, dass die jungen Männchen einen durchschnittlichen Wert von 1,88 % \pm 1,05 % aufweisen, die alten Männchen im Durchschnitt 1,46 % \pm 0,56 % fehlerhaft protaminierte Spermien besitzen. Es wurde die statistische Auswertung mit den zunächst winkeltransformierten Daten in Form eines t-Tests durchgeführt. Die Auswertung zeigte, dass sich die Spermien der Mäuse in Bezug auf die Protaminierung mit einem $p = 0,215$ nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.2.3 DNA-Strangbrüche

Zusätzlich wurden die Spermien der jungen und der alten Mäuse auf DNA-Strangbrüche untersucht. Auch hier kann die Vermutung aufgestellt werden, dass Spermien, die vermehrt DNA-Strangbrüche aufweisen, sich bei älteren Mäusen statt in die Apoptose zu gehen zu reifen Spermien entwickeln.

3.2.3.1 AOT

Es wurden sechs 13 Monate alte C57BL-Mäuse analysiert und mit drei zwei bis vier Monate alten C57BL-Mäusen verglichen. Der Versuch und die anschließende Auswertung wurden wie unter 3.1.2.2 (S. 23) beschrieben durchgeführt.

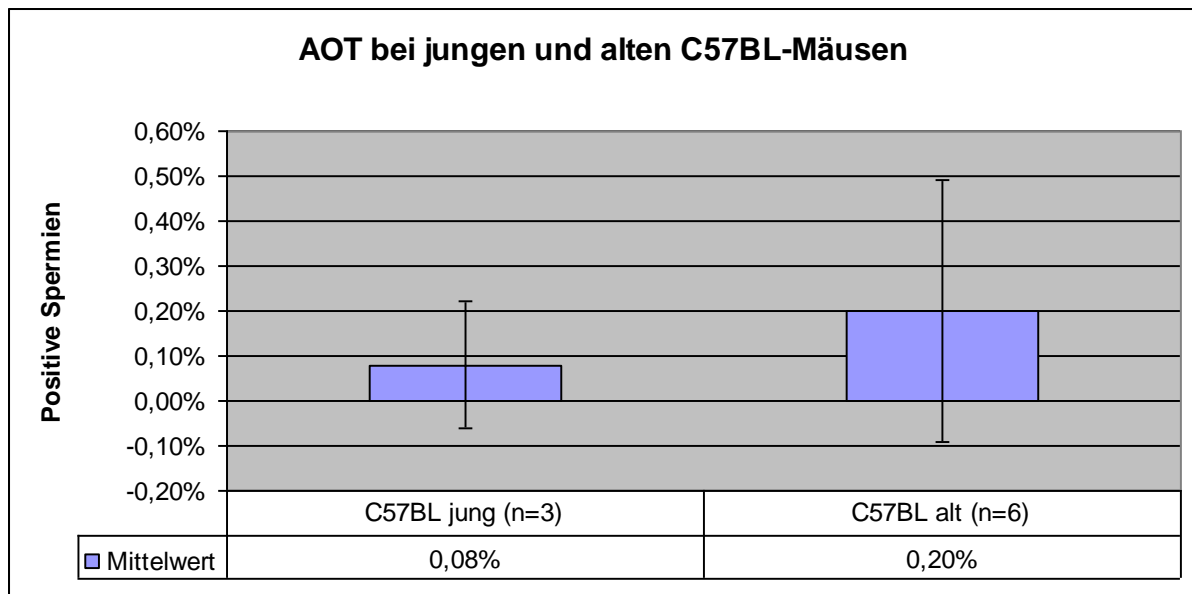


Abbildung 13 Anzahl von AOT-positiven Spermien in jungen und in alten C57BL-Mäusen, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen (Abb. 13) liegt bei den jungen Mäusen bei 0,08 % \pm 0,14 % und bei den alten Mäusen bei 0,20 % \pm 0,29 %.

Die Ergebnisse wurden anschließend winkeltransformiert und mit Hilfe des t-Tests ausgewertet. Dieser zeigte mit einem $p = 0,588$, dass sich die Anzahl der Spermien mit fragmentierter DNA in jungen und in alten C57BL-Männchen nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Zusammengefasst kann man sagen, dass sich die alten C57BL-Männchen nur in der Anzahl von apoptotischen Keimzellen in den Hoden signifikant von den jungen C57BL-Männchen unterscheiden. Jedoch liegen alle Werte bei beiden Gruppen in sehr niedrigen Bereichen. Im Grad der Protaminierung und bezüglich der DNA-Strangbrüche in den Spermien unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander.

3.3 Vergleich von Wildtyp- und Knockout-Mäusen

In einem weiteren Schritt wurden verschiedene Knockout-Mäuse untersucht. Es stellte sich die Frage, wie sich die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen und Fehlern in der Protaminierung im Verhältnis zur Anzahl von ausgeknockten Genen verhalten. Es handelt sich bei den untersuchten Mäusen um Knockout-Mäuse, die auf dem gemischten Hintergrund

von 129/Sv-, CD1- und C57BL-Mäusen entstanden und bei denen ein bis zu sechs Keimzell-spezifische Gene ausgeknockt worden sind.

In einem ersten Schritt wurden jeweils folgende Gene ausgeknockt: *Acr* (Acrosin) (Adham et al. 1997, Nayernia et al. 2002); *Tnp2* (Transitions Protein 2) (Adham et al. 2001); *Histlhlt* (Histon H1t) (Drabent et al. 2000); *Theg* (*testicular haploid expressed gene*) (Mannan et al. 2003); *Creb3l4* (*cAMP responsive element binding protein 3-like 4*) (Adham et al. 2005) und *Tep22* (*testis expressed gene 22*) (Geisler 2004).

Da diese Knockout-Mäuse jedoch alle fertil sind, wurden in einem nächsten Schritt Mehrfach-Knockout-Mäuse generiert. Es wurden insgesamt bis zu sechs Gene ausgeknockt (Abb. 14). Im Rahmen dieser Dissertation wurde die DNA in den Spermien der Mäuse der verschiedenen Linien auf den Grad der Protaminierung und die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen untersucht.

1-KO *Acr* (PRR)

2-KO *Acr/Tnp2* (DKO4)

3-KO *Acr/Tnp2/Histlhlt* (DKO12)

4-KO *Acr/Tnp2/Histlhlt/Theg* (DKO19)

5-KO *Acr/Tnp2/Histlhlt/Theg/Creb3l4* (DKO23)

6-KO *Acr/Tnp2/Histlhlt/Theg/Creb3l4/Tep22* (DKO34)

Abbildung 14 Schema der ausgeknockten Gene der in dieser Arbeit verwendeten Knockout-Mäuse. In Klammern befindet sich die jeweilige Bezeichnung der Maus-Linien.

Alle Mehrfach-Knockout-Mäuse waren wiederum fertil bis auf die 6-KO Linie (DKO34). In dieser Linie findet man sowohl fertile als auch infertile Männchen.

3.3.1 Protaminierung in Knockout-Mäusen

Um Erkenntnisse über das Zusammenspiel der in 3.3 genannten Gene mit der Protaminierung zu erhalten, wurde die Protaminierung in einem ersten Schritt untersucht.

3.3.1.1 CMA3

Der Versuch wurde wie unter 3.1.1.1 (S. 19) durchgeführt. Es wurden je drei bis vier Tiere im Alter von zwei bis elf Monaten pro Linie untersucht.

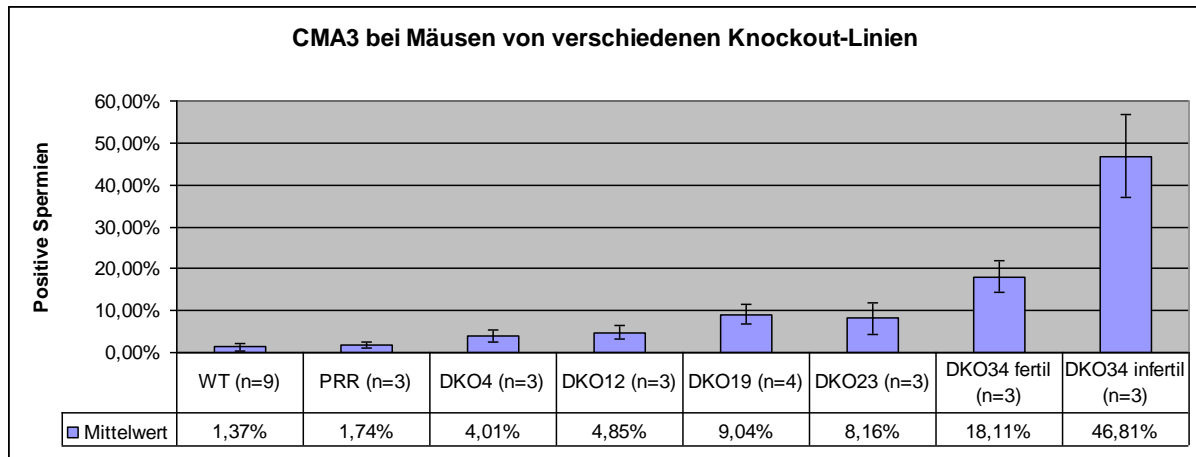


Abbildung 15 Anzahl von CMA3-positiven Spermien in Mäusen von verschiedenen Knockout-Linien, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Aus den Ergebnissen (Abb. 15) ist erkennbar, dass die Fehlerrate bei der Protaminierung bei den untersuchten Knockout-Mäusen im Durchschnitt zwischen 1,74 % \pm 0,70 % und 46,81 % \pm 9,82 % liegt und mit der Anzahl von ausgeknockten Genen ansteigt. Es wurde ein ANOVA-Test mit den winkeltransformierten Ergebnissen durchgeführt. Da $F = 62,48$ und $p < 0,0001$ war, konnte man signifikante Unterschiede zwischen den analysierten Gruppen erwarten. Aus diesem Grund wurde anschließend eine Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für ungleich große Proben durchgeführt.

	WT	PRR	DKO4	DKO12	DKO19	DKO23	DKO34 Fertil	DKO34 infertil
WT		0,99976	0,42215	0,18893	0,00047	0,00676	0,00015	0,00015
PRR	0,99976		0,69774	0,39023	0,00615	0,01922	0,00015	0,00015
DKO4	0,42215	0,69774		0,99949	0,21549	0,45654	0,00038	0,00015
DKO12	0,18893	0,39023	0,99949		0,46593	0,76481	0,00102	0,00015
DKO19	0,00047	0,00615	0,21549	0,46593		0,99958	0,10022	0,00015
DKO23	0,00676	0,01922	0,45654	0,76481	0,99958		0,03557	0,00015
DKO34 fertil	0,00015	0,00015	0,00038	0,00102	0,10022	0,03557		0,00015
DKO34 infertil	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	

Tabelle 2 Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für CMA3-positive Spermien in verschiedenen Knockout-Linien.

Die rot markierten Werte stellen einen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Linien ($p < 0,05$) dar.

Die Analyse (Tab. 2) zeigt, dass sich die Knockout-Mäuse mit bis zu drei ausgeknockten Genen (PRR, DKO4 und DKO12) mit $p > 0,05$ hinsichtlich des Grades der Protaminierung von den Wildtyp-Mäusen und untereinander nicht signifikant unterscheiden. Bei vier bis fünf ausgeknockten Genen (DKO19 und DKO23) ist mit $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied

zwischen diesen Linien und den Wildtyp-Linien, PRR und DKO34 infertil (bei DKO24 auch DKO34 fertil, s. u.) festzustellen. Bei den sechsfach Knockout-Mäusen (DKO34 fertil und infertil) findet man signifikant mehr Spermien mit einer unvollständigen Protaminierung, $p < 0,01$ (bzw. DKO34 fertil zu DKO23 mit $p = 0,035$), als in den übrigen Linien. Ausgenommen ist hier der nicht signifikante Unterschied zwischen DKO34 fertil und DKO19 mit $p = 0,10$.

3.3.1.2 Anilinblau

Des Weiteren wurden die Spermien mit Anilinblau untersucht. Hierfür wurden drei biologische Replikate von zwei bis sieben Monate alten Mäusen analysiert. Bei der Durchführung und der Auswertung wurde wie unter 3.1.1.2 (S. 21) beschrieben verfahren.

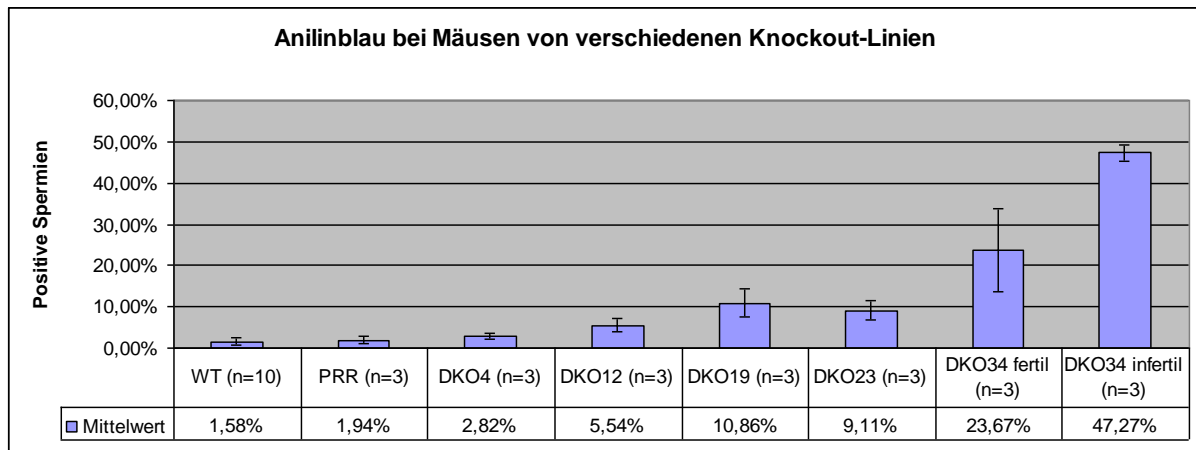


Abbildung 16 Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in Mäusen von verschiedenen Knockout-Linien, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

In Abbildung 16 wird ersichtlich, dass die durchschnittliche Fehlerrate in der Protaminierung bei den Knockout-Mäusen eine Spannweite von $1,94 \% \pm 0,99 \%$ bis $47,27 \% \pm 1,90 \%$ aufweist. Des Weiteren kommt es zu einem Ansteigen des Wertes mit der Zunahme an ausgeknockten Genen.

Weiter wurden eine ANOVA ($F = 32,79$; $p < 0,00001$) und eine Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für ungleich große Proben durchgeführt.

	WT	PRR	DKO4	DKO12	DKO19	DKO23	DKO34 fertil	DKO34 infertil
WT		1	0,99999	0,98598	0,45448	0,69805	0,00014	0,00014
PRR	1		0,99999	0,99037	0,48696	0,73014	0,00017	0,00014
DKO4	0,99999	0,99999		0,99830	0,61050	0,83600	0,00020	0,00014
DKO12	0,98598	0,99037	0,99830		0,92180	0,99089	0,00042	0,00014
DKO19	0,45448	0,48696	0,61050	0,92180		0,99990	0,00603	0,00014
DKO23	0,69805	0,73014	0,83600	0,99089	0,99990		0,00237	0,00014
DKO34 fertil	0,00014	0,00017	0,00020	0,00042	0,0060	0,00237		0,01103
DKO34 infertil	0,00014	0,00014	0,00014	0,00014	0,00014	0,00014	0,01103	

Tabelle 3 Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für Anilinblau-positive Spermien in verschiedenen Knockout-Linien. Die rot markierten Werte stellen einen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Linien ($p < 0,05$) dar.

Die Analyse (Tab. 3) zeigt, dass sich die Knockout-Mäuse mit bis zu fünf ausgeknockten Genen (PRR, DKO4, DKO12, DKO19 und DKO23) mit $p > 0,05$ in Bezug auf die Protaminierung weder signifikant von den Wildtyp-Mäusen noch voneinander unterscheiden. Bei den sechsfach Knockout-Mäusen (DKO34 fertil und infertil) lassen sich signifikant mehr Spermien mit Defiziten in der Protaminierung als bei den übrigen Linien mit $p < 0,05$ finden. Auch die fertilen und die infertilen DKO34-Mäuse unterscheiden sich mit $p = 0,01103$ signifikant voneinander.

3.3.2 DNA-Strangbrüche in Knockout-Mäusen

Da DNA-Strangbrüche zu einem großen Teil während der Keimzellentwicklung entstehen können, sollte untersucht werden, wie sich das Ausknocken Keimzell-spezifischer Gene auf die Entstehung von DNA-Strangbrüchen in Spermien auswirkt.

3.3.2.1 TUNEL

Die Mäuse der verschiedenen Knockout-Linien wurden mit TUNEL untersucht. Dazu wurden pro Linie drei bis vier Mäuse im Alter von zwei bis acht Monaten analysiert. Der Versuch und die Auswertung wurden wie unter 3.1.2.1 (S. 22) beschrieben durchgeführt.

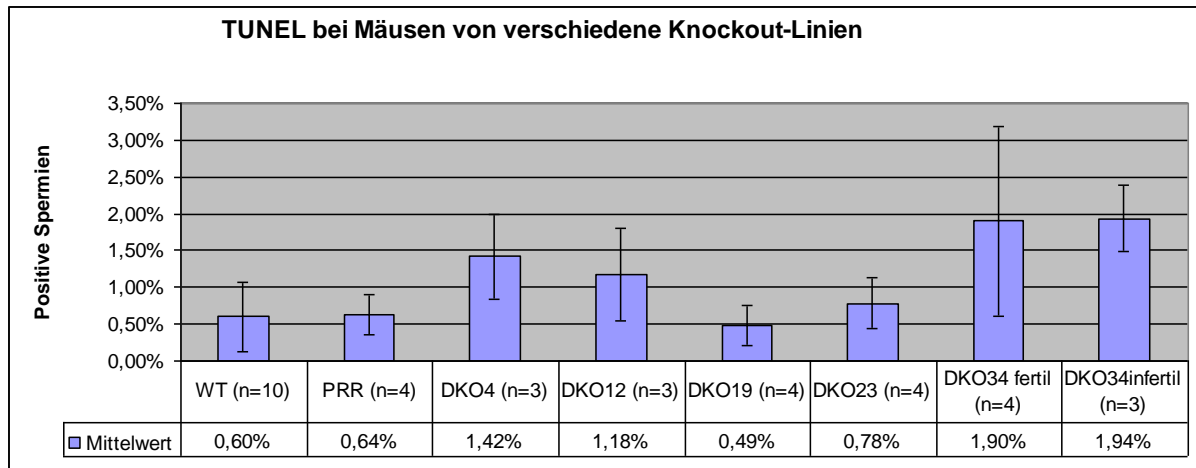


Abbildung 17 Anzahl von TUNEL-positiven Spermien in Mäusen von verschiedenen Knockout-Linien, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

In Abbildung 17 ist erkennbar, dass die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen bei den Tieren der verschiedenen Linien im Durchschnitt unter 1,94 % liegt. Zusätzlich weisen die Linien eine Varianz von 0,64 % \pm 0,35 % bis 1,94 % \pm 0,44 % auf. Die Ergebnisse wurden anschließend winkeltransformiert. Mit ihnen wurde weiter eine ANOVA ($F = 4,6$; $p < 0,01$) und eine Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für ungleich große Proben durchgeführt.

	WT	PRR	DKO4	DKO12	DKO19	DKO23	DKO34 fertil	DKO34 Infertil
WT		0,99999	0,50796	0,83823	0,99944	0,99908	0,07884	0,08494
PRR	0,99999		0,64860	0,92506	0,99271	0,99998	0,13391	0,13407
DKO4	0,50796	0,64860		0,99910	0,26281	0,80192	0,99716	0,96216
DKO12	0,83823	0,92506	0,99910		0,57628	0,97964	0,91401	0,73999
DKO19	0,99944	0,99271	0,26281	0,57628		0,95372	0,02432	0,03111
DKO23	0,99908	0,99998	0,80192	0,97964	0,95372		0,23555	0,21953
DKO34 fertil	0,07884	0,13391	0,99716	0,91401	0,02432	0,23555		0,99994
DKO34 infertil	0,08494	0,13407	0,96216	0,73999	0,03111	0,21953	0,99994	

Tabelle 4 Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für TUNEL-positive Spermien in verschiedenen Knockout-Linien. Die rot markierten Werte stellen einen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Linien ($p < 0,05$) dar.

Die statistische Auswertung (Tab. 4) zeigt, dass DKO34 fertil und infertil mit $p = 0,02$ und $p = 0,03$ signifikant mehr Spermien mit DNA-Strangbrüchen aufweisen als DKO19. Die übrigen Linien unterscheiden sich mit $p > 0,05$ nicht signifikant voneinander.

3.3.2.2 AOT

Weiter wurden die Spermien der Knockout-Mäuse mit Acridinorange angefärbt. Hierfür wurden die Spermien wie oben beschrieben (3.1.2.2, s. S. 23) gefärbt und ausgewertet. Es wurden jeweils drei Tiere pro Linie untersucht. Die Mäuse waren in einem Alter von zwei bis acht Monaten.

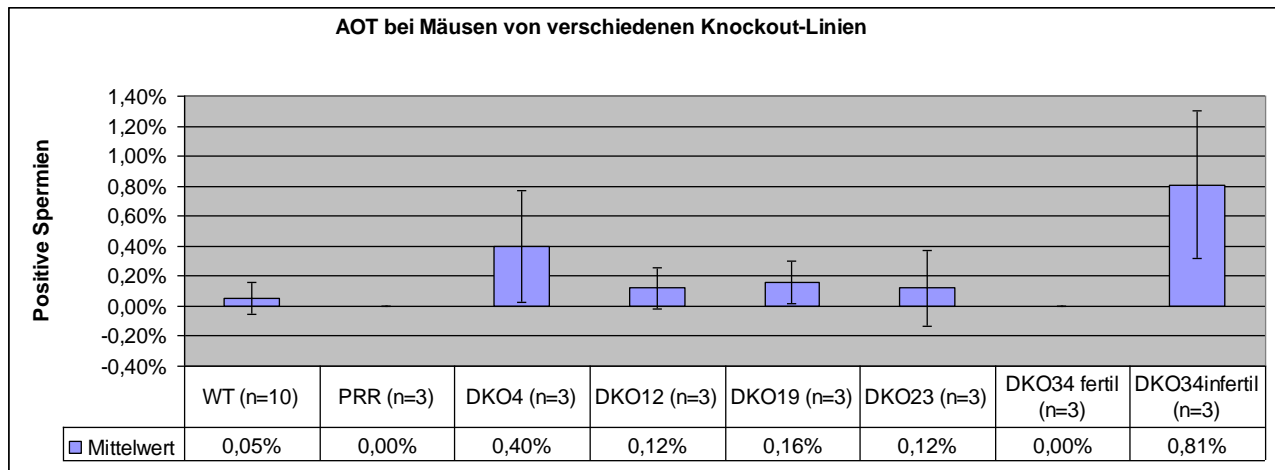


Abbildung 18 Anzahl von AOT-positiven Spermien in Mäusen von verschiedenen Knockout-Linien, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen, die mit AOT gemessen und in Abbildung 18 dargestellt ist, hat eine Spannweite von 0,00 % bis zu 0,81 % \pm 0,49 %. Auch hier wurde mit den winkeltransformierten Ergebnissen eine ANOVA ($F = 3,92$; $p < 0,01$) und eine Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für ungleich große Proben durchgeführt.

	WT	PRR	DKO4	DKO12	DKO19	DKO23	DKO34 fertil	DKO34 Infertil
WT		0,99976	0,56689	0,99202	0,96370	0,99991	0,99976	0,03311
PRR	0,99976		0,30646	0,93994	0,80256	0,99149	1,00000	0,01146
DKO4	0,56689	0,30646		0,92222	0,98746	0,77354	0,30646	0,75017
DKO12	0,99202	0,93994	0,92222		0,99996	0,99991	0,93994	0,14007
DKO19	0,96370	0,80256	0,98746	0,99996		0,99646	0,80256	0,26223
DKO23	0,99991	0,99149	0,77354	0,99991	0,99646		0,99149	0,07014
DKO34 fertil	0,99976	1,00000	0,30646	0,93994	0,80256	0,99149		0,01146
DKO34 infertil	0,03311	0,01146	0,75017	0,14007	0,26223	0,07014	0,01146	

Tabelle 5 Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für AOT-positive Spermien in verschiedenen Knockout-Linien. Die rot markierten Werte stellen einen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Linien ($p < 0,05$) dar.

Die Analyse (Tab. 5) zeigt, dass sich lediglich DKO34 infertil von WT ($p = 0,03311$), PRR ($p = 0,01146$) und DKO34 fertil ($p = 0,01146$) signifikant unterscheiden, d. h. dass die Tiere der DKO34 infertil-Linie signifikant mehr Spermien mit DNA-Strangbrüchen aufweisen als die oben genannten Linien. Diese unterscheiden sich mit $p > 0,05$ nicht signifikant voneinander.

3.4 Korrelationsanalysen

Dem nächsten Arbeitsschritt lag die Frage zu Grunde, ob es eine Korrelation zwischen CMA3 und Anilinblau, zwischen TUNEL und AOT und zwischen den DNA-Strangbrüchen und der Protaminierung in multiplen Knockout-Mäusen gibt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse der oben genannten Untersuchungen mit diversen Spermien- und Fertilitätsparametern, die in Arbeiten des Instituts (Veröffentlichung folgt) erfasst worden sind, korrelieren.

3.4.1 Korrelationsanalyse zwischen CMA3 und Anilinblau

Hintergrund dieser Analyse war die Frage, ob die oben genannten Methoden, die dieselbe Fragestellung auf unterschiedliche Art und Weise behandeln, die gleichen Ergebnisse liefern. Deswegen wurde hier mit den wiederum winkeltransformierten Ergebnissen eine Pearson-r-Korrelation bei Normalverteilung durchgeführt. Die Werte aus den Untersuchungen der Wildtyp- und der Knockout-Linien wurden miteinander korreliert.

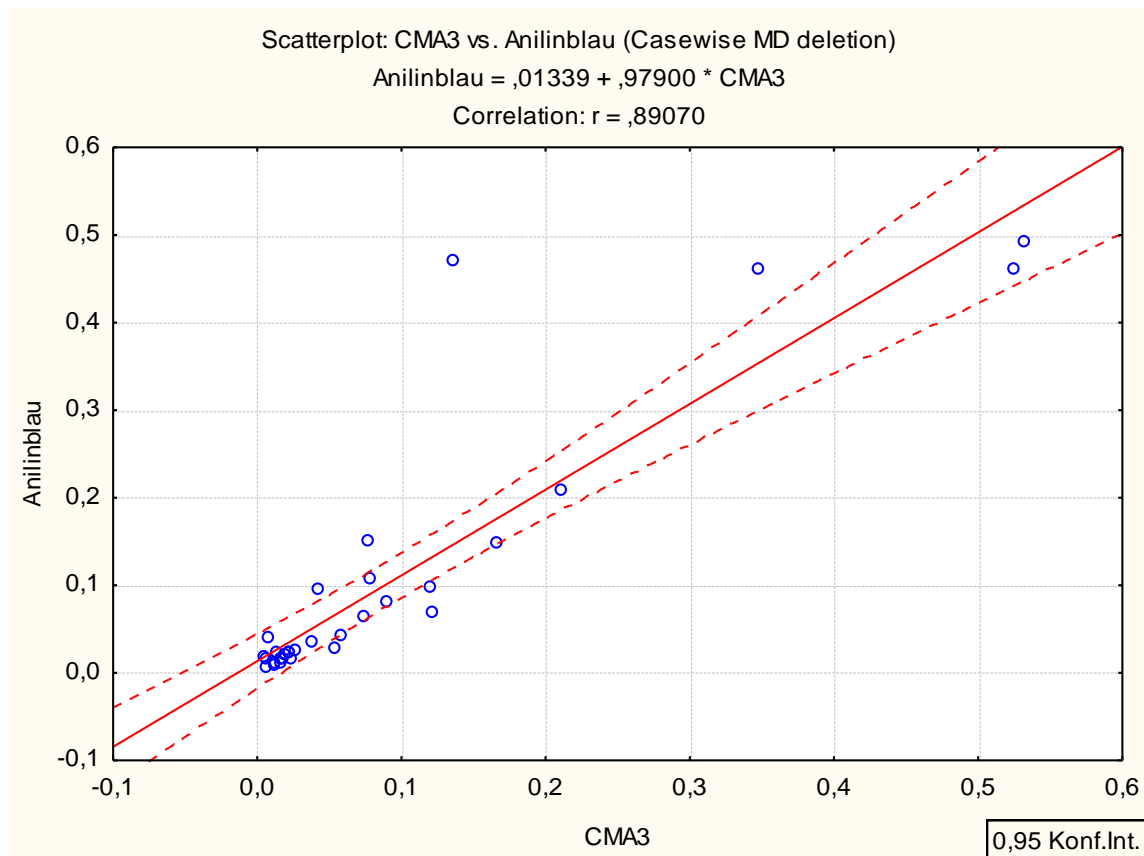


Abbildung 19 Korrelationsanalyse zwischen den Ergebnissen des Grades der Protaminierung in verschiedenen Knockout-Mäusen, welche mit CMA3 und Anilinblau erfasst worden sind.

Die Analyse (Abb. 19) zeigt, dass die Werte für den Grad der Protaminierung, die mit Anilinblau und CMA3 gemessen worden sind, mit $r = 0,89$ positiv und mit $p < 0,05$ signifikant miteinander korrelieren. Das bedeutet, dass beide Analysen vergleichbare Ergebnisse geliefert haben.

3.4.2 Korrelationsanalyse zwischen TUNEL und AOT

In der Literatur findet man verschiedene Methoden, mit denen DNA-Strangbrüche in den Spermien untersucht werden. Die verschiedenen Methoden führen z. T. zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, inwieweit die Ergebnisse von TUNEL und AOT miteinander korrelieren.

Auch hier wurde mit den winkeltransformierten Ergebnissen eine Pearson-r-Korrelation bei Normalverteilung durchgeführt.

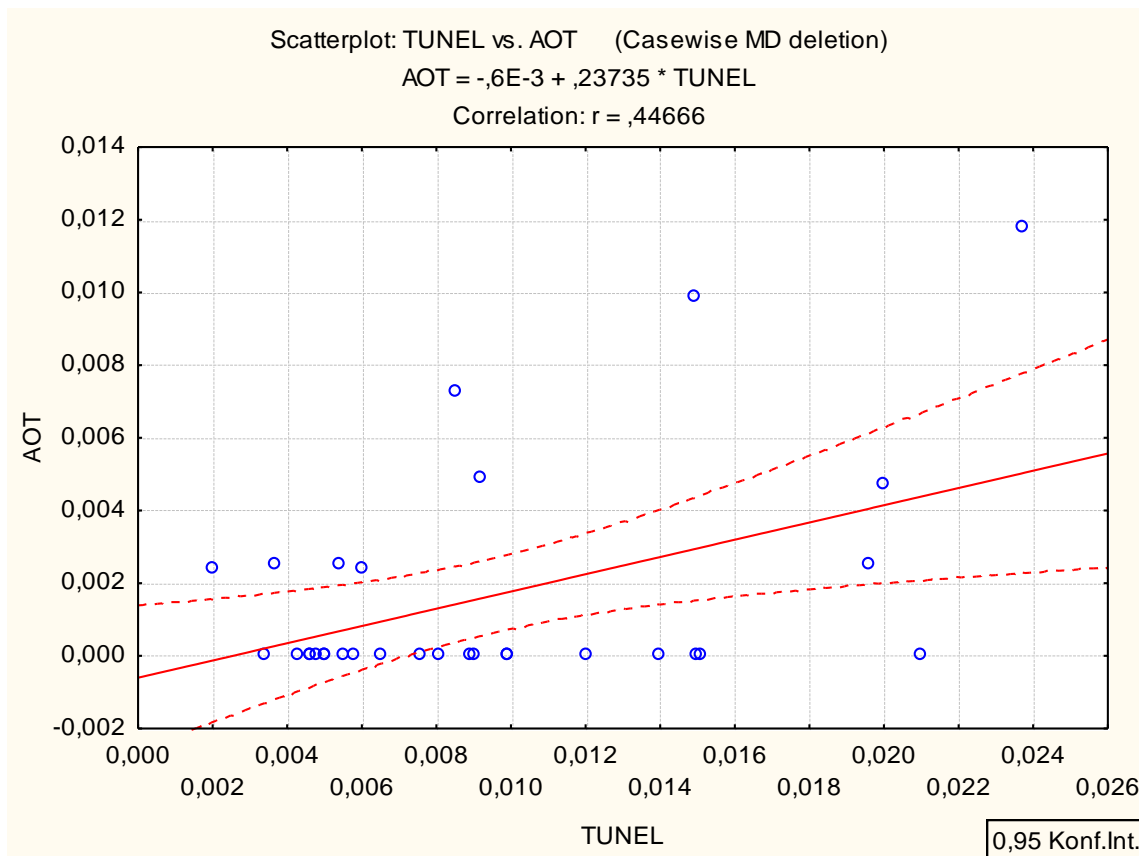


Abbildung 20 Korrelationsanalyse zwischen den Ergebnissen der Untersuchung der DNA-Strangbrüche in verschiedenen Knockout-Mäusen, welche mit TUNEL und Acridinorange erfasst worden sind.

Die Analyse (Abb. 20) zeigt, dass die Werte mit $r = 0,45$ positiv, aber schwach und signifikant ($p < 0,05$) miteinander korrelieren.

3.4.3 Korrelationsanalyse zwischen DNA-Strangbrüchen und Protaminierung

Ausschlaggebend für diese Analyse war der Gedanke, dass die DNA-Strangbrüche in den Spermien z. T. im Zuge der Protaminierung entstehen, und es somit die Möglichkeit gibt, dass diese Faktoren sich gegenseitig beeinflussen. Es wurden die winkeltransformierten Ergebnisse verwendet, die im Rahmen der Analyse der Wildtyp- und der Knockout-Mäuse gewonnen wurden, um eine Pearson-r-Korrelation bei Normalverteilung durchzuführen (Tab. 6).

	TUNEL	AOT	CMA3	Anilinblau
TUNEL		0,45	0,68	0,50
AOT	0,45		0,63	0,54
CMA3	0,68	0,63		0,89
Anilinblau	0,50	0,54	0,89	

Tabelle 6 Korrelationsanalyse zwischen den DNA-Strangbrüchen und der Protaminierung, rot markierte Werte sind mit $p < 0,05$ signifikant.

Diese Analyse zeigt, dass alle Werte miteinander signifikant und positiv korrelieren, wobei die Korrelation zwischen CMA3 und Anilinblau mit $r = 0,89$ am stärksten und zwischen TUNEL und AOT mit $r = 0,45$ am schwächsten ist.

3.4.4 Korrelationsanalyse zwischen DNA-Strangbrüchen, Protaminierung und weiteren Spermienparametern

Weiter sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen den ermittelten Werten der DNA-Strangbrüche und der Fehlerrate in der Protaminierung und weiteren Fertilitätsparametern gibt. Bei den anderen Parametern handelt es sich namentlich um die Wurfgröße und die Anzahl der Spermien im Nebenhodenschwanz (NHS) sowie die Spermienzahl im Uterus und im Ovidukt des verpaarten Weibchens.

Die Analysen der entsprechenden Parameter in den oben untersuchten Mäuse-Linien wurden von Herrn Dr. Grzmil durchgeführt. Die Ergebnisse (Tab. 7) wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

	Mittelwert	SD
Wurfgröße	4,462	3,711
Sp. NHS	1,423	0,672
Sp. Uterus	2,564	2,973
Sp. Ovidukt	2081,346	2801,966

Tabelle 7 Mittelwerte aller Linien und die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) der verschiedenen Parameter. Wurfgröße (Nachkommen/Wurf), Spermien (Sp.) im Nebenhodenschwanz (NHS) ($\times 10^7$), im Uterus ($\times 10^6$) und im Ovidukt (absolut).

Mit den oben genannten (Tab. 7) und den in dieser Arbeit gewonnen Ergebnissen wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

	Wurfgröße	Sp. NHS	Sp. Uterus	Sp. Ovidukt	TUNEL	AOT	CMA3	Anilinblau
Wurfgröße		-0,32	0,53	0,18	-0,33	0,11	-0,51	-0,53
Sp. NHS	-0,32		0,42	-0,16	-0,22	-0,41	-0,03	0
Sp. Uterus	0,53	0,42		0,27	-0,32	-0,15	-0,2	-0,31
Sp. Ovidukt	0,18	-0,16	0,27		-0,11	0,02	-0,13	-0,26
TUNEL	-0,33	-0,22	-0,32	-0,11		0,22	0,54	0,22
AOT	0,11	-0,41	-0,15	0,02	0,22		0,37	0,21
CMA3	-0,51	-0,03	-0,2	-0,13	0,54	0,37		0,81
Anilinblau	-0,53	0	-0,31	-0,26	0,22	0,21	0,81	

Tabelle 8 Korrelationsanalyse zwischen den verschiedenen Spermienparametern.

Die Analyse (Tab.8) zeigt, dass die Spermien- oder Fertilitätsparameter nicht mit der Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen oder einer fehlerhaften Protaminierung korrelieren.

3.5 Untersuchung von *Pxt1*-Knockout-Mäusen

Als nächstes sollte in dieser Arbeit die Bedeutung der Protaminierung und der DNA-Strangbrüche bei *Pxt1*-Knockout-Mäusen (*Pxt1*^{-/-}) untersucht werden. Das Gen *Pxt1* steht für „*Peroxisomal Testis-specific 1*“, welches 2007 zum ersten Mal von Grzmil et al. beschrieben worden ist (Grzmil et al. 2007). Dieses Gen ist ausschließlich in männlichen Keimzellen exprimiert. Es enthält eine BH3-Domäne, welche proapoptotisch wirkt (Kaczmarek 2009, Kaczmarek et al. 2011). Es wird vermutet, dass durch ein Ausknocken des Gens *Pxt1* weniger defekte Keimzellen in Apoptose gehen. Es stellt sich nun die Frage, ob bei den *Pxt1*^{-/-}-Mäusen die Anzahl von Spermien mit Fehlern in der Protaminierung und mit DNA-Strangbrüchen erhöht ist, da defekte Zellen nicht mehr apoptotisch werden.

Verglichen wurden die Ergebnisse mit 129/Sv- und C57BL-Wildtyp-Mäusen, auf deren Hintergrund die *Pxt1*^{-/-}-Mäuse generiert wurden.

3.5.1 Protaminierung

In einem ersten Schritt wurde der Grad der Protaminierung analysiert. Es sollte untersucht werden, wie sich die Anzahl der Spermien mit Fehlern in der Protaminierung bei den *Pxt1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verhält.

3.5.1.1 CMA3

Es wurden insgesamt vier *Pxt1*^{-/-}-Mäuse im Alter von zwei Monaten untersucht und mit insgesamt sechs zwei bis fünf Monate alten 129/Sv- und C57BL-Männchen verglichen. Die Proben wurden wie oben beschrieben (3.1.1.1, s. S. 19) analysiert und ausgewertet.

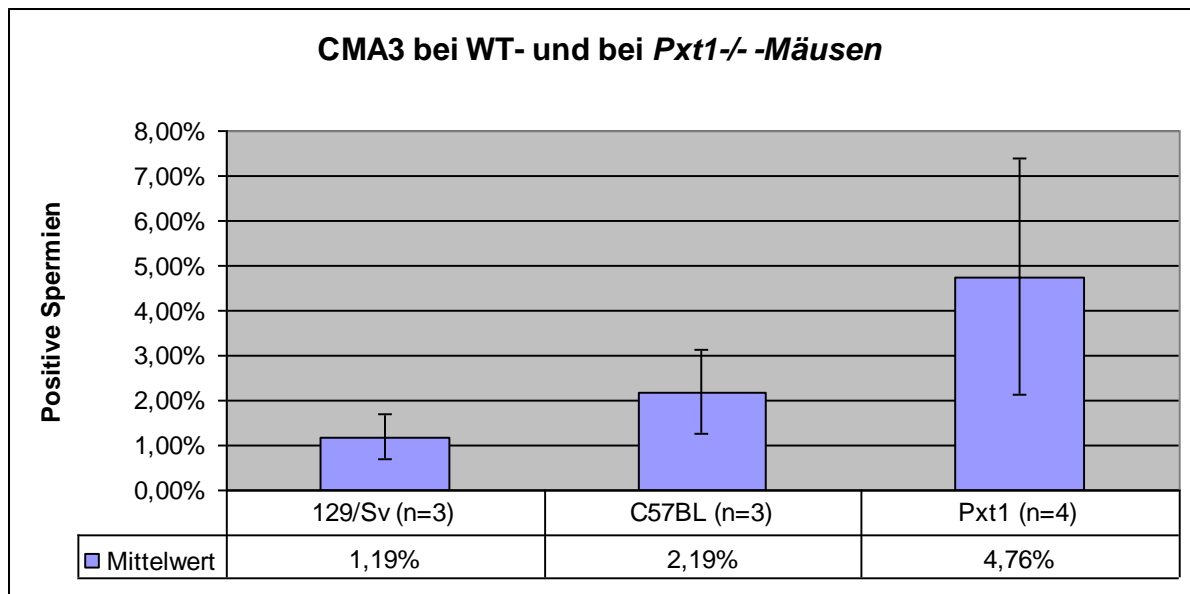


Abbildung 21 Anzahl von CMA3-positiven Spermien in *Pxt1*^{-/-}- und WT-Mäusen (129/Sv und C57BL), angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Ergebnisse (Abb. 21) zeigen, dass die Fehlerrate in der Protaminierung bei den Wildtyp-Mäusen zwischen 1,19 % ± 0,51 % und 2,19 % ± 0,93 % und bei den *Pxt1*^{-/-}-Mäusen bei 4,76 % ± 2,64 % liegt. Die Daten wurden winkeltransformiert und jeweils zwischen den Ergebnissen der Knockout- und der Wildtyp-Mäuse ein t-Test durchgeführt. Die t-Tests zeigten, dass sich die Spermien der C57BL- und *Pxt1*^{-/-}-Mäuse mit einem $p = 0,25$ und die der 129/Sv- und *Pxt1*^{-/-}-Mäuse mit einem $p = 0,078$ hinsichtlich der Protaminierung nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.5.1.2 Anilinblau

Hier wurden jeweils vier *Pxt1*^{-/-}-Mäuse im Alter von zwei Monaten analysiert und mit insgesamt sieben Wildtyp-Mäusen im Alter von vier bis zehn Monaten verglichen. Der Versuch und die Auswertung wurden wie oben beschrieben (3.1.1.2, s. S. 21) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 zusammengefasst.

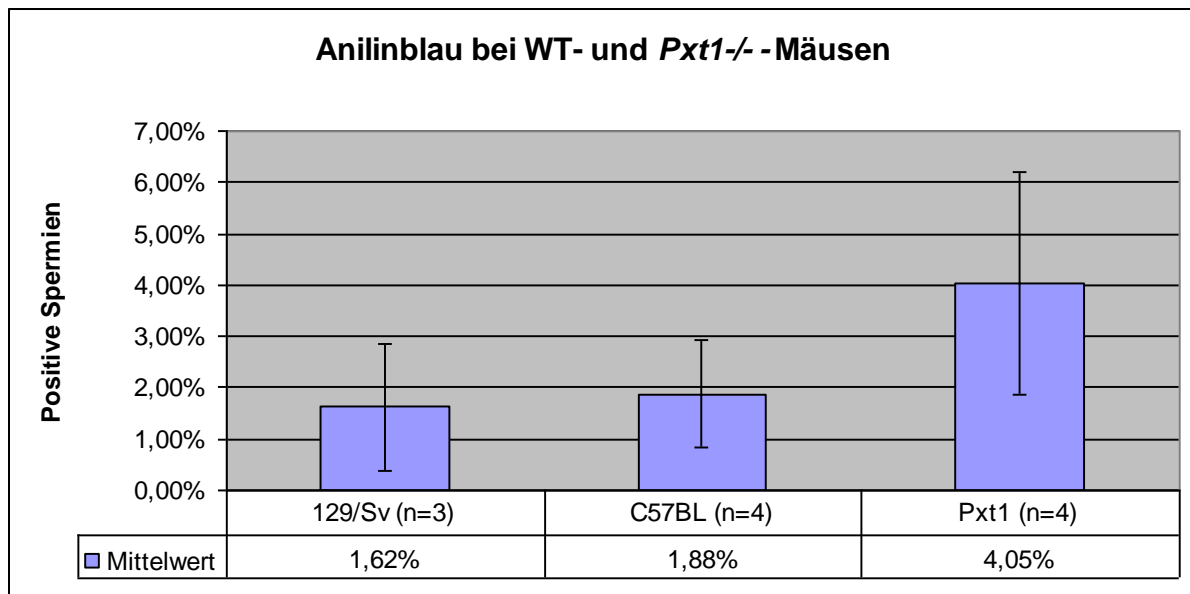


Abbildung 22 Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in *Pxt1*^{-/-}- und WT-Mäusen (129/Sv und C57BL), angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Auswertung zeigt, dass die Werte der Wildtyp-Mäuse zwischen 1,62 % ± 1,24 % und 1,88 % ± 1,05 % liegen, die Werte der Knockout-Mäuse bei 4,05 % ± 2,17 %. Es wurde mit den winkeltransformierten Werten ein t-Test durchgeführt, in dem die *Pxt1*^{-/-}-Mäuse jeweils mit den 129/Sv- und den C57BL-Mäusen verglichen wurden. Der Test zeigt, dass sich die Spermien der 129/Sv-Mäuse mit einem $p = 0,54$ und die Spermien der C57BL-Mäuse mit einem $p = 0,62$ in Bezug auf die Protaminierung nicht signifikant von den Spermien der *Pxt1*^{-/-}-Mäuse unterscheiden.

3.5.2 DNA-Strangbrüche

Zusätzlich wurden die DNA-Strangbrüche in den Spermien untersucht. Normalerweise geht man davon aus, dass defekte Keimzellen in Apoptose gehen, z. B. wenn sie eine erhöhte Anzahl von DNA-Strangbrüchen aufweisen. Wir haben angenommen, dass dies durch das Ausknocken des *Pxt1*-Gens jedoch nur noch in einem reduzierten Maße möglich ist. Wir haben daher vermutet, dass in den *Pxt1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen gefunden werden kann.

3.5.2.1 TUNEL

Das TUNEL-Assay wurde mit drei zwei Monate alten *Pxt1*^{-/-}-Mäusen durchgeführt und mit insgesamt sieben 129/Sv- und C57BL-Mäusen im Alter von vier bis zehn Monaten verglichen. Die Durchführung und die Auswertung des Versuches waren identisch wie unter 3.1.2.1 (S. 22) beschrieben.

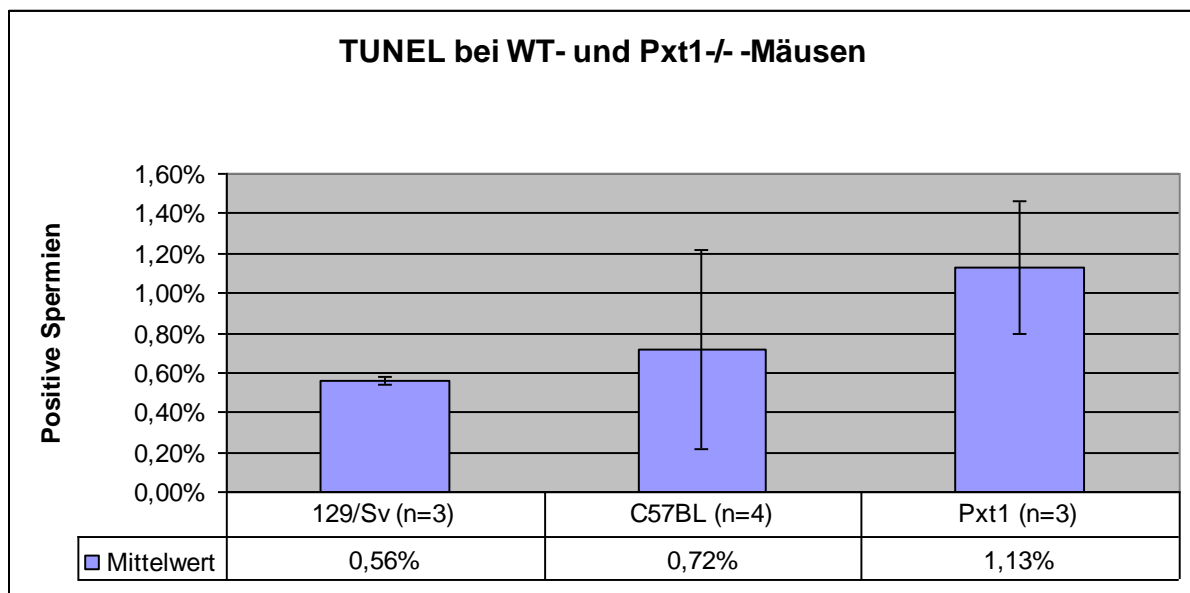


Abbildung 23 Anzahl von TUNEL-positiven Spermien bei *Pxt1*^{-/-}- und WT-Mäusen (129/Sv und C57BL), angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Auswertung (Abb. 23) zeigt, dass die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen bei 129/Sv und C57BL zwischen 0,56 % ± 0,02 % und 0,72 % ± 0,50 % und die Werte der Knockout-Mäuse bei 1,13 % ± 0,33 % liegen. Mit jeweils zwei Variablen der Ergebnisse, die in einem ersten Schritt winkeltransformiert wurden, wurde ein t-Test durchgeführt. Die Anzahlen der Spermien mit DNA-Strangbrüchen der 129/Sv- und der *Pxt1*^{-/-}-Mäuse unterscheiden sich mit einem $p = 0,023$ signifikant, die der C57BL- und *Pxt1*^{-/-}-Mäuse unterscheiden sich mit einem $p = 0,240$ nicht signifikant voneinander.

3.5.2.2 AOT

Es wurde auch eine Färbung der Spermien mit Acridinorange durchgeführt. Diese und die Auswertung ist wie oben beschrieben (3.1.2.2, s. S. 23) durchgeführt worden. Es wurden insgesamt vier zwei Monate alte *Pxt1*^{-/-}-Mäuse untersucht und mit insgesamt sechs zwei bis

zehn Monate alten Wildtyp-Mäusen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

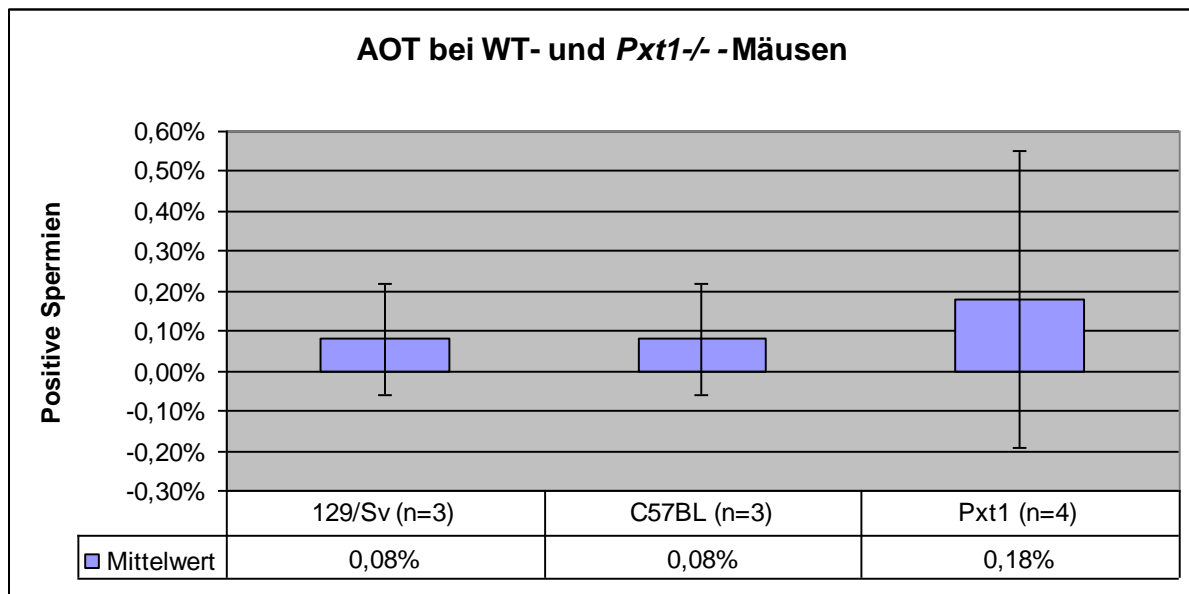


Abbildung 24 Anzahl von AOT-positiven Spermien bei *Pxt1*^{-/-}- und WT-Mäusen (129/Sv und C57BL), angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Auswertung zeigt, dass die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen mit dieser Methode bei den Wildtyp-Mäusen jeweils bei 0,08 % ± 0,14 % und bei den Knockout-Mäusen bei 0,18 % ± 0,37 % liegt. Es wurde eine statistische Auswertung durchgeführt. Hierfür wurden die Ergebnisse winkeltransformiert. In einem zweiten Schritt wurden sie mit einem t-Test analysiert. Der t-Test zwischen den 129/Sv- und den *Pxt1*^{-/-}-Mäusen und den C57BL- und den *Pxt1*^{-/-}-Mäusen ergab jeweils ein $p = 0,877$ und zeigt somit, dass sich die Spermien der Mäuse hinsichtlich der Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.5.3 Induktion von DNA-Strangbrüchen

Die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen in den *Pxt1*^{-/-}-Knockout-Mäusen war gering. Zusätzlich hat sie sich nicht signifikant von der bei Wildtyp-Mäusen (129/Sv- und C57BL-Mäuse) unterschieden (ausgenommen sind hier die Ergebnisse des TUNEL-Assays mit den 129/Sv-Mäusen, da hier ein signifikanter Unterschied vorhanden ist). In einem weiteren Schritt sollte nun untersucht werden, ob sich die Mäuse im Hinblick auf die Induzierbarkeit von DNA-Strangbrüchen voneinander unterscheiden.

Für den Versuch wurden jeweils drei *Pxt1*^{-/-}-Mäuse mit drei 129/Sv-Mäusen verglichen. Die Mäuse waren in einem Alter zwischen zwei bis fünf Monaten. Zur Induktion wurde DNase I verwendet, welche die DNA verdaut. Dadurch entstehen DNA-Strangbrüche mit freien 3'OH-Enden. Diese können mit dem TUNEL-Assay nachgewiesen werden. Die Spermien wurden jeweils mit 4 U DNase I inkubiert, wobei 1 Unit DNase I 1 µg DNA in 10 min bei 37 °C zu Oligonukleotiden verdaut. Inkubiert wurden die Spermien jeweils 0, 5 und 10 min bei Raumtemperatur. In Vorversuchen sind die Spermien zusätzlich 20, 30 und 60 min mit DNase I behandelt worden. Jedoch konnten die Spermien nach der Färbung nicht mehr zuverlässig ausgewertet werden. Der Unterschied zwischen positiven und negativen Spermien war durch eine vermehrte Anfärbung der scheinbar negativen Spermien (wahrscheinlich aufgrund einer beginnenden Denaturierung) nicht mehr eindeutig bestimmbar. Aus diesem Grund wurden die Spermien in den nachfolgenden Versuchen nur 0, 5 und 10 min mit Dnase I inkubiert.

Die Mäuse wurden abgetötet, die Nebenhoden isoliert und die Spermien aus den Nebenhodenschwänzen gewonnen. Anschließend wurden die Spermien auf Objektträgern (je ein Objektträger pro Maus) ausgestrichen. Im weiteren Verlauf wurden die Spermien mit PFA fixiert, mit Proteinase K permeabilisiert, mit DNase I induziert und schließlich mit TUNEL gefärbt. Es wurde zusätzlich (wie unter 2.2.5 beschrieben) eine Null-Kontrolle durchgeführt. Insgesamt wurden etwa 200 Spermien gezählt und ausgewertet. Dabei wurde zwischen stark grün leuchtenden positiven Spermien und sehr schwach grün leuchtenden negativen Spermien unterschieden. Gewertet wurden nur die Durchgänge, in denen die Negativkontrolle negativ ausfiel.

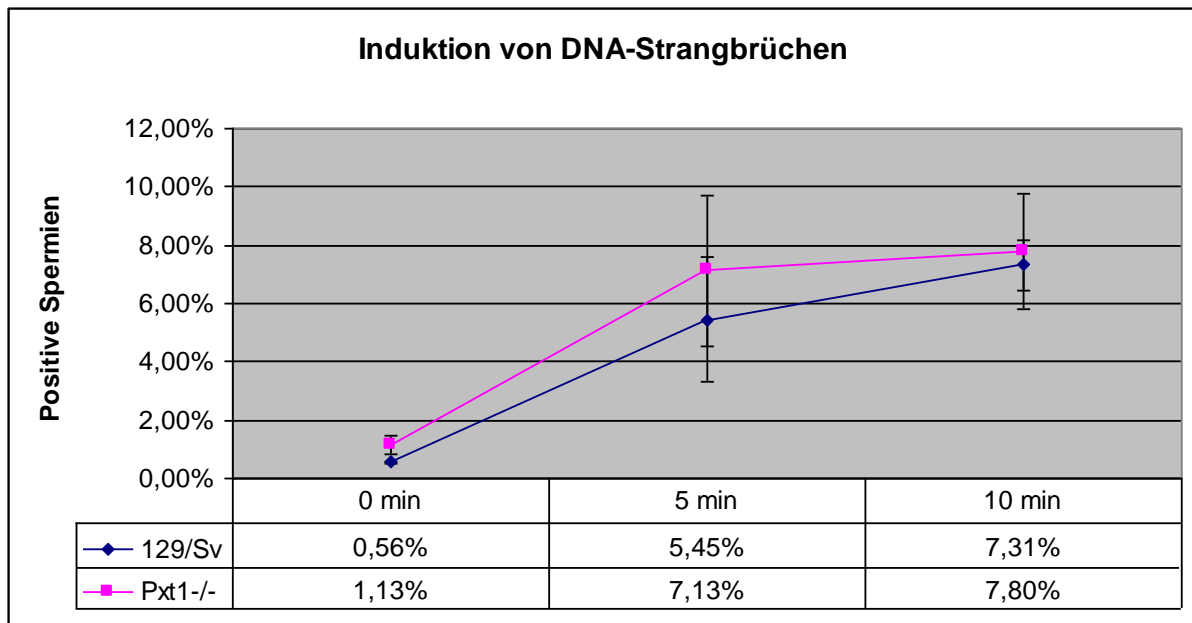


Abbildung 25 Anzahl von TUNEL-positiven Spermien zu den Zeitpunkten 0 min, 5 min und 10 min nach der Inkubation mit DNase I in 129/Sv- und *Pxt1*^{-/-}-Mäusen, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Ergebnisse (Abb. 25) zeigen, dass die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen während der zehnmütigen Inkubation mit DNase I bei den 129/Sv-Mäusen von 0,56 % ± 0,02 % auf 7,31 % ± 0,84 % und bei den *Pxt1*^{-/-}-Mäusen von 1,13 % ± 0,3 % auf 7,80 % ± 1,96 % ansteigt.

Die Ergebnisse wurden zuerst winkeltransformiert und dann einem t-Test mit den Ergebnissen zu den jeweiligen Zeitpunkten zugeführt. Der t-Test zum Zeitpunkt 0 min zeigte mit einem $p = 0,023$, dass sich die Ergebnisse der 129/Sv- und der *Pxt1*^{-/-}-Mäuse signifikant voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse zum Zeitpunkt 5 min ($p = 0,438$) und 10 min ($p = 0,754$) haben ergeben, dass sich die jeweilige Anzahl von Spermien mit induzierten DNA-Strangbrüchen zu diesen Zeitpunkten nicht mehr signifikant voneinander unterscheiden.

3.5.4 Analyse von apoptotischen Keimzellen

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich die *Pxt1*-Knockout-Mäuse in der Anzahl von apoptotischen Keimzellen im Hoden von Wildtyp Mäusen unterscheiden. Hierfür wurden insgesamt elf 129/Sv- und neun *Pxt1*^{-/-}-Mäuse im Alter zwischen drei und vier Monaten untersucht. Der Versuch und die Auswertung wurden wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

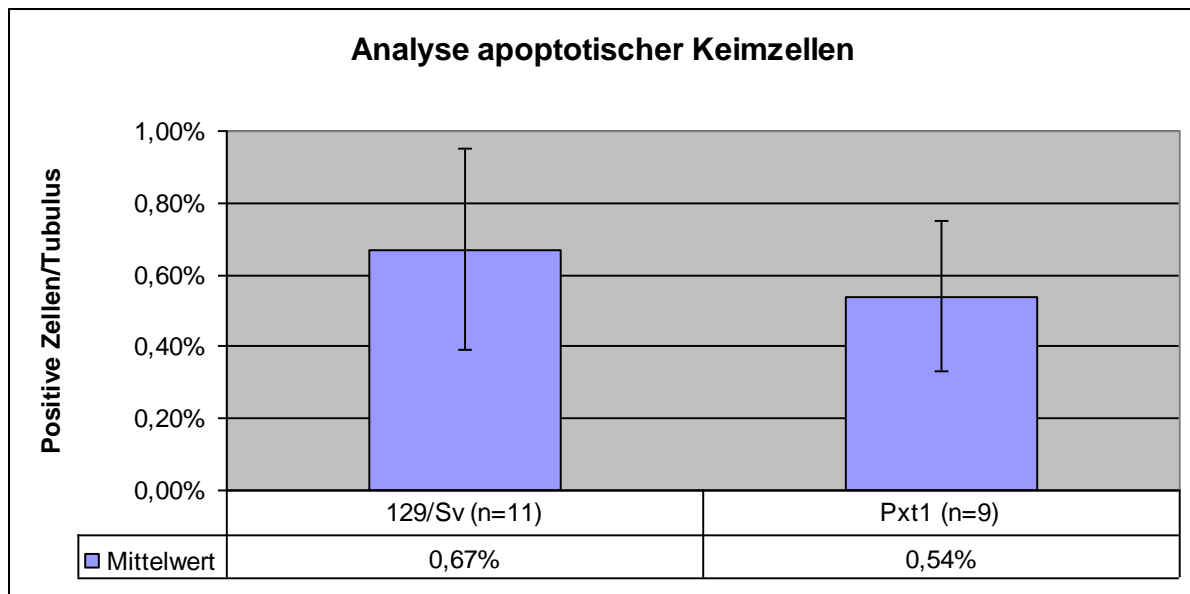


Abbildung 26 Anzahl von apoptotischen Keimzellen pro Tubulus in den Testis von *Pxt1*^{-/-}- und 129/Sv-Mäusen, gemessen mit Apoptag. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl von apoptotischen Keimzellen pro Tubulus bei den 129/Sv-Männchen bei $0,67 \pm 0,28$ und $0,54 \pm 0,21$ liegt. Ein durchgeführter t-Test ergab, dass sich die untersuchten Mäuse mit einem $p > 0,05$ nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.6 Untersuchung von verschiedenen Spezies

Die bisherigen Untersuchungen beschäftigten sich nur mit den Werten von DNA-Strangbrüchen und der Fehlerrate der Protaminierung in Mäusen. Sucht man in der Literatur nach vergleichbaren Analysen beim Menschen, so findet man für beide Parameter z. T. sehr viel höhere Werte (z. B. Tavalae et al. 2009, Venkatesh et al. 2011). Es stellt sich nun die Frage, ob es ein Tiermodell gibt, das eher mit dem Menschen vergleichbar ist, um auch eine größere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen.

Um diese Frage zu beantworten, wurden verschiedene Säugerspezies untersucht: Rhesusaffe (*Macaca mulatta*), Schwein (*Sus scrofa domestica*), Schaf (*Ovis orientalis aries*), Ziege (*Capra aegagrus hircus*), Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) und Ratte (*Rattus rattus*). Zusätzlich wurden eigene Untersuchungen an humanen Spermien durchgeführt. Die Anzahl von Individuen pro Spezies ergab sich aus der Verfügbarkeit der jeweiligen Proben. Die

Angaben der Werte der Wildtyp-Maus, die bereits in dieser Arbeit dargestellt worden sind, wurden in die folgenden Darstellungen mit aufgenommen.

3.6.1 Protaminierung

Es wurde untersucht, wie sich die Anzahl von Spermien mit einer unvollständigen Protaminierung in den verschiedenen Spezies verhält.

3.6.1.1 CMA3

Pro Spezies wurden zwei bis vier Individuen untersucht. Der Versuch und die Auswertung wurden wie unter 3.1.1.1 (S. 19) durchgeführt.

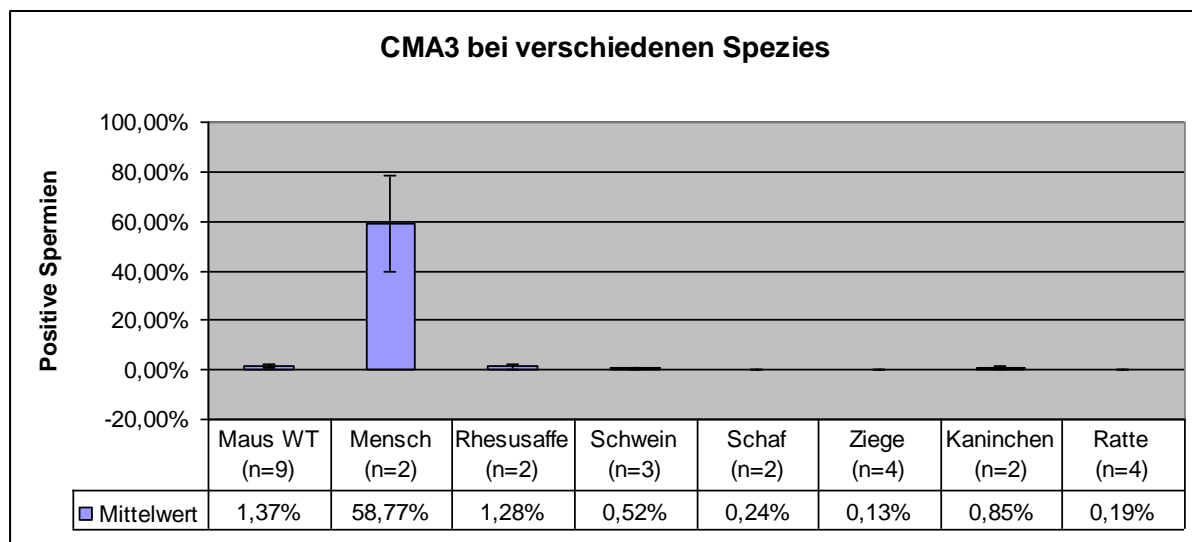


Abbildung 27 Anzahl von CMA3-positiven Spermien in verschiedenen Spezies, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Diese Untersuchung (Abb. 27) zeigt, dass die humanen Spermien mit einem Durchschnitt von 58,77 % \pm 19,48 % die höchste und die Spermien der Ziege mit 0,13 % \pm 0,13 % die niedrigste Fehlerrate bei der Protaminierung aufweisen. Zusätzlich wurde eine ANOVA ($F = 46,66$; $p < 0,00001$) und eine Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für ungleich große Proben mit den winkeltransformierten Werten durchgeführt.

	Maus	Mensch	Rhesus- affe	Schwein	Schaf	Ziege	Kanin- chen	Ratte
Maus		0,00016	0,99999	0,99849	0,98954	0,76520	0,99999	0,58625
Mensch	0,00016		0,00016	0,00016	0,00016	0,00016	0,00016	0,00016
Rhesusaffe	0,99999	0,00016		0,99814	0,97595	0,91139	0,99999	0,82385
Schwein	0,99849	0,00016	0,99814		0,99997	0,99397	0,99996	0,96714
Schaf	0,98954	0,00016	0,97595	0,99997		0,99999	0,99654	0,99959
Ziege	0,76520	0,00016	0,91139	0,99397	0,99999		0,97436	0,99998
Kaninchen	0,99999	0,00016	0,99999	0,99996	0,99654	0,97436		0,92869
Ratte	0,58625	0,00016	0,82385	0,96714	0,99959	0,99998	0,92869	

Tabelle 9 Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für CMA3-positive Spermien in verschiedenen Spezies. Die rot markierten Werte stellen einen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Spezies ($p < 0,05$) dar.

Die Auswertung (Tab. 9) zeigt, dass lediglich der Mensch mit jeweils einem $p = 0,00016$ signifikant mehr Spermien als die übrigen Spezies aufweist, in denen die Protaminierung unvollständig abgelaufen ist. Zwischen den übrigen Spezies ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

3.6.1.2 Anilinblau

Die Spermien der verschiedenen Spezies wurden zusätzlich mit Anilinblau untersucht. Hierbei wurden pro Spezies zwischen zwei und vier Proben analysiert. Der Versuch wurde wie oben beschrieben (3.1.1.2, s. S. 21) durchgeführt und ausgewertet.

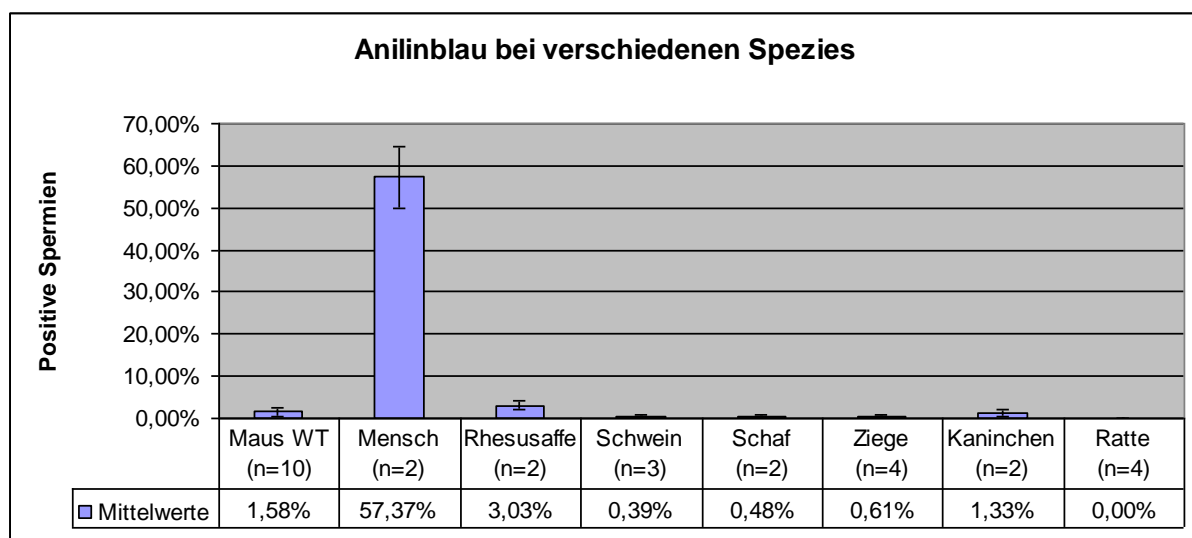


Abbildung 28 Anzahl von Anilinblau-positiven Spermien in verschiedenen Spezies, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Ergebnisse (Abb. 28) zeigen, dass die Fehlerrate bei der Protaminierung in den humanen Spermien mit $57,37\% \pm 7,38\%$ am höchsten und bei der Ratte mit $0,00\%$ am niedrigsten ist. Auch hier wurden eine ANOVA ($F = 210,55$; $p < 0,00001$) und eine Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für ungleich große Proben mit den winkeltransformierten Ergebnissen durchgeführt.

	Maus	Mensch	Rhesus- affe	Schwein	Schaf	Ziege	Kanin- chen	Ratte
Maus		0,00014	0,28610	0,13894	0,89393	0,73312	0,99999	0,00055
Mensch	0,00014		0,00014	0,00014	0,00014	0,00014	0,00014	0,00014
Rhesusaffe	0,28610	0,00014		0,00670	0,02100	0,03831	0,40458	0,00018
Schwein	0,13894	0,00014	0,00670		0,99966	0,92985	0,49863	0,15023
Schaf	0,89393	0,00014	0,02100	0,99966		0,99999	0,78893	0,26770
Ziege	0,73312	0,00014	0,03831	0,92985	0,99999		0,90590	0,01539
Kaninchen	0,99999	0,00014	0,40458	0,49863	0,78893	0,90590		0,01109
Ratte	0,00055	0,00014	0,00018	0,15023	0,26770	0,01539	0,01109	

Tabelle 10 Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für Anilinblau-positive Spermien in verschiedenen Spezies. Die rot markierten Werte stellen einen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Spezies ($p < 0,05$) dar.

Es wird erkennbar (Tab. 10), dass sich der Mensch im Grad der Protaminierung mit einem $p = 0,00014$ signifikant von den übrigen Spezies unterscheidet, also signifikant mehr Spermien besitzt, in denen die Protaminierung unvollständig abgelaufen ist. Zusätzlich unterscheidet sich der Rhesusaffe vom Schwein ($p = 0,0067$), vom Schaf ($p = 0,021$), von der Ziege ($p = 0,038$) und von der Ratte ($p = 0,00018$). Des Weiteren lässt sich ein signifikanter Unterschied in dem Grad der Protaminierung zwischen Ratte und Ziege ($p = 0,015$) und Ratte und Kaninchen ($p = 0,011$) finden.

3.6.2 DNA-Strangbrüche

Weiterhin wurde die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen in den verschiedenen Spezies untersucht.

3.6.2.1 AOT

Die DNA-Strangbrüche wurden mit Acridinorange untersucht. Hierzu wurden pro Spezies zwei bis vier Proben wie unter 3.1.2.2 (S. 23) beschrieben analysiert und ausgewertet.

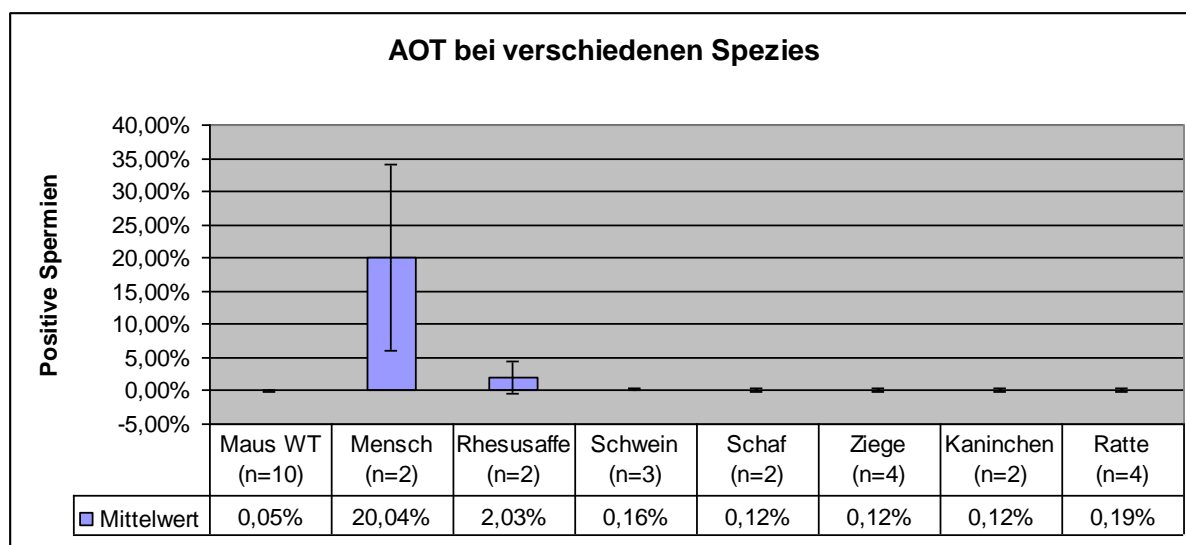


Abbildung 29 Anzahl von AOT-positiven Spermien in verschiedenen Spezies, angegeben in %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Die Abbildung 29 zeigt, dass die niedrigsten Mittelwerte mit 0,12 % bei Schafen ($\pm 0,17$ %), Ziegen ($\pm 0,28$ %) und Kaninchen ($\pm 0,17$ %) und die höchsten Werte mit 20,04 % $\pm 14,08$ % beim Menschen gefunden werden. Weiter wurde mit den winkeltransformierten Ergebnissen eine ANOVA ($F = 18,65$; $p < 0,00001$) und eine Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für ungleich große Proben durchgeführt.

	Maus	Mensch	Rhesus- affe	Schwein	Schaf	Ziege	Kanin- chen	Ratte
Maus		0,00015	0,40649	0,99904	0,99999	0,99999	0,99999	0,99997
Mensch	0,00015		0,00020	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
Rhesusaffe	0,40649	0,00020		0,68306	0,58027	0,49712	0,58027	0,54721
Schwein	0,99904	0,00015	0,68306		0,99999	0,99994	0,99999	0,99999
Schaf	0,99999	0,00015	0,58027	0,99999		0,99999	0,99999	0,99999
Ziege	0,99999	0,00015	0,49712	0,99994	0,99999		0,99999	0,99999
Kaninchen	0,99999	0,00015	0,58027	0,99999	0,99999	0,99999		0,99999
Ratte	0,99997	0,00015	0,54721	0,99999	0,99999	0,99999	0,99999	

Tabelle 11 Post-hoc-Tukey-HSD-Analyse für AOT-positive Spermien in verschiedenen Spezies. Die rot markierten Werte stellen einen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Spezies ($p < 0,05$) dar.

Die Auswertung (Tab. 11) zeigt, dass sich einzig der Mensch mit einem $p = 0,00015$ bzw. $p = 0,00020$ signifikant von den übrigen Spezies unterscheidet, also signifikant mehr Spermien mit DNA-Strangbrüchen aufweist als die übrigen Spezies. Die anderen Spezies unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

4 Diskussion

Im Zuge dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass DNA-Strangbrüche in den Spermien der Maus nur in geringem Maße auftreten. Ebenso spielten mögliche Fehler in der Protaminierung bei Mäusen nur eine untergeordnete Rolle.

Bei der Analyse von alten und jungen Mäusen zeigte sich im Verhältnis zu den alten Mäusen eine signifikant höhere Anzahl apoptotischer Keimzellen in den Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) der jungen Mäuse. Bei der Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen und solcher mit einer fehlerhaften Protaminierung konnte hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Betrachtung von Mäusen aus multiplen Knockout-Linien zeigte keine Veränderung in der Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen mit der Zunahme an ausgeknockten Genen. Bei der Untersuchung der Protaminierung zeigte sich jedoch, dass die Fehlerrate mit zunehmender Zahl an ausgeknockten Genen steigt. Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen den DNA-Strangbrüchen und der Fehlerrate in der Protaminierung gefunden. Zwischen den Ergebnissen der Analyse der DNA-Strangbrüche sowie der Protaminierung und anderen Spermienparametern konnte hingegen kein statistischer Zusammenhang gefunden werden.

Ferner wurden *Pxt1*-Knockout-Mäuse (*Pxt1*^{-/-}) untersucht und mit 129/Sv- und C57BL-Mäusen verglichen. Hier zeigte sich, dass sich die untersuchten Mäuse in Bezug auf eine unvollständige Protaminierung in den Spermien nicht signifikant voneinander unterscheiden. Bei der TUNEL-Analyse konnte gezeigt werden, dass die *Pxt1*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den 129/Sv-Mäusen signifikant mehr Spermien mit DNA-Strangbrüchen aufwiesen. Daraufhin wurde die Induktion von DNA-Strangbrüchen bei 129/Sv- und *Pxt1*^{-/-}-Mäusen analysiert. Hier konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Mäusen gefunden werden. Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von apoptotischen Keimzellen in den Hoden von 129/Sv- und *Pxt1*^{-/-}-Mäusen festgestellt werden.

Da die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, dass die Anzahl der DNA-Strangbrüche sowohl bei Wildtyp- als auch bei Knockout-Mäusen sehr gering ausfallen, wurden zusätzlich die Spermien von anderen Tierarten auf DNA-Strangbrüche untersucht und mit dem Menschen verglichen. Hier zeigte sich, dass die meisten anderen Tierarten im Vergleich zum Menschen eine niedrigere Rate an DNA-Strangbrüchen aufwiesen. Neben dem

Menschen zeigte lediglich der Rhesusaffe eine erhöhte Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen und einer unvollständigen Protaminierung.

4.1 DNA-Strangbrüche beim Menschen

In der gängigen Literatur kann man sehr unterschiedliche Meinungen zu der Bedeutung von DNA-Strangbrüchen im Zusammenhang mit männlicher Infertilität und der in diesem Fall häufig anschließend durchgeführten assistierten Reproduktionsbehandlung (Assisted Reproductive Technology, ART) finden.

Eine der Arbeiten, die hier einen Zusammenhang sieht, ist die Arbeit von Giwercman et al. (2010). In dieser Studie wurden 137 fertile und 127 infertile Männer untersucht, wobei die Spermien dieser Männer mit SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) analysiert wurden. Bei dieser Methode werden die Spermien mit Hilfe einer Säure denaturiert, anschließend mit Acridinorange angefärbt und letztendlich mittels einer Durchflusszytometrie ausgewertet. Diese Studie kam zu dem Ergebnis, dass bei Männern, die eine erhöhte Anzahl an Spermien mit DNA-Strangbrüchen aufweisen, das Risiko der Infertilität 2,5 bis 8,4 höher ist als bei Männern mit wenigen defekten Spermien (Giwercman et al. 2010). In der Arbeit von Simon et al. (2010) wird ein Zusammenhang zwischen beiden Faktoren deutlich. Insgesamt wurden in dieser Studie 360 Männer untersucht, die sich einer Infertilitätsbehandlung unterzogen haben. Die Spermien dieser Männer wurden mit dem Comet Assay analysiert (COMET), bei dem die DNA-Strangbrüche in den einzelnen Spermien mit Hilfe einer Gelelektrophorese dargestellt werden können. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der IVF-Behandlung (In-vitro-Fertilisation) die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen negativ mit der Fertilisationsrate und der Schwangerschaftsrate korreliert (Simon et al. 2010). Auch in anderen Studien und Reviews konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen und der Auswirkung auf die Schwangerschaftsrate gezeigt werden (Morris et al. 2002, Benchaib et al. 2003, Sergerie et al. 2005, Speyer et al. 2010, Brahem et al. 2011a, Beshay und Bukulmez 2012, Erenpreiss et al. 2008). In einem Review von Zini (2011), in dem insgesamt 39 Studien analysiert wurden, wurden ähnliche Schlüsse aufgezeigt. Es konnte auch hier gezeigt werden, dass einer hohen Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen bei der natürlichen Befruchtung sowie bei der Intrauterine Insemination (IUI) und der IVF mit einer niedrigen Schwangerschaftsrate assoziiert ist (Zini 2011).

Davon abweichende Ergebnisse zeigt die Studie von Lin et al. (2008). Hier wurden insgesamt 223 Patienten im Rahmen der ART untersucht. Es wurde SCSA zur Analyse der DNA-

Strangbrüche verwendet. In dieser Studie wurden die Probanden anhand der Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Zusätzlich wurde zwischen IVF und ICSI unterschieden. Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich der Befruchtungsrates, der Embryoqualität und dem Eintreten einer Schwangerschaft gefunden werden. Aus diesem Grund schlossen Lin et al., dass die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen mit den untersuchten Parametern nicht in Verbindung stehe (Lin et al. 2008).

Es gibt weitere Arbeiten, die keinen Zusammenhang zwischen den DNA-Strangbrüchen und dem Erfolg einer ICSI-Behandlung sehen (Høst et al 2000, Simon et al. 2010, Zini 2011, Sadeghi et al. 2011, Thomson et al. 2011). Es ist bekannt, dass bei ICSI für die Befruchtung morphologisch einwandfreie Spermien ausgewählt werden und im Anschluss die Embryonen eingepflanzt werden, die sich am besten entwickelt haben (Gandini et al. 2004). Das könnte diese Ergebnisse erklären. Collins et al. (2008) stellten zwar einen gewissen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen und dem Ausgang der ART fest (Odds Ratio 1,44), hielten diesen aber für zu geringfügig, als dass die Untersuchung der DNA-Strangbrüche in die Standarduntersuchungen der Spermien mit aufgenommen werden sollte (Collins et al. 2008).

Trotz vieler Kontroversen hat die WHO hingegen die Untersuchung der DNA-Strangbrüche 2010 in ihr Manual zur Untersuchung von humanen Spermien aufgenommen und empfohlen (WHO 2010).

Insgesamt besteht bei den in der Literatur verfügbaren Studien ein Problem hinsichtlich der genauen Vergleichbarkeit. Jede Studie untersucht ihre eigenen Patienten - mit jeweils unterschiedlichen Methoden und Herangehensweisen. Zum einen ist es entscheidend, wie die Methode durchgeführt wird, und zum anderen, wie die Ergebnisse ausgewertet werden. Dies wirkt sich auf die von Studie zu Studie zum Teil stark abweichenden Werte aus. Hinzu kommen die weiblichen Faktoren, die den Ausgang der künstlichen Befruchtung beeinflussen (diskutiert in Aitken et al. 2009). Außerdem messen einige Methoden nur die Einzelstrangbrüche (AOT und SCSA), andere hingegen können sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektieren (COMET und TUNEL). Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Methoden eine unterschiedliche Sensitivität aufweisen (Shamsi et al. 2008).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Studien auf Grund von verschiedenen Studiendesigns nicht zuverlässig miteinander vergleichbar sind. Deshalb wäre es wichtig, die Untersuchungen zu standardisieren, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen

Labore gewährleisten zu können. Insgesamt lassen sich in der Literatur aber deutlich mehr Studien finden, die den DNA-Strangbrüchen in Bezug auf die Infertilität und das Ergebnis der assistierten Reproduktionsbehandlung eine wichtige Bedeutung beimessen.

4.2 DNA-Strangbrüche bei der Maus

Ist die Maus ein geeignetes Modell, um die Bedeutung von DNA-Strangbrüchen in Spermien in Bezug auf die Fertilität zu untersuchen? Im Zuge der Auswertung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen in den verschiedenen Mäuse-Stämmen (FVB, CD1, C57BL und 129/Sv) mit den verwendeten Methoden, TUNEL und AOT bei unter 1 % lag. Fast identisch sind die Ergebnisse von Bauer et al (2005). Diese untersuchten mit Hilfe von AOT die Spermien in unterschiedlichen Reifestadien an verschiedenen Stellen im Nebenhoden (Caput und Cauda epididimidis) und im Ductus deferens der Maus. Sie konnten im Caput epididimidis noch etwa $5\% \pm 4\%$ positive Spermien nachweisen, in der Cauda epididimidis und im Ductus deferens fanden sich jedoch keine Spermien mit DNA-Strangbrüchen (Bauer et al. 2005). Auch andere Untersuchungen fanden bei der Analyse der DNA-Strangbrüche in Mäuse-Spermien niedrige Werte. Bei den verschiedenen Mäuse-Stämmen konnten mit SCSA Werte zwischen $1,6\% \pm 0,2\%$ und $4,8\% \pm 1,3\%$ (CD1, C57BL und 129/Sv) ermittelt werden (Yildiz et al. 2007). Andere Studien kamen bei derselben Methode auf Werte von $1,76\% \pm 0,18\%$ (ICR-CD1) (Oliveira et al. 2009), $2,7\% \pm 1,8\%$ (129/Sv) (Libman et al. 2010) bzw. $5,9\% \pm 1,2\%$ (C57BL/6) (Okun et al. 2007). Auch die Analyse mit TUNEL zeigt ähnliche Ergebnisse. Man kann hier Werte zwischen $1,91\% \pm 0,35\%$ (ICR-CD1) (Oliveira et al. 2009) und $5\% \pm 1\%$ (B6D2) (Pérez-Crespo et al. 2008) finden.

Eine Ausnahme stellt die Arbeit von Fernández-Gonzalez et al. (2008) dar. In dieser Analyse fanden die Autoren mit Hilfe von TUNEL in $7\% \pm 4\%$ der Spermien von CD1-Mäusen DNA-Strangbrüche (Fernández-Gonzalez et al. 2008). Diese Ergebnisse sind höher als die in dieser Arbeit erhobenen und die in der übrigen Literatur gefundenen Werte.

Der Unterschied aller Arbeiten liegt in den unterschiedlichen Mäuse-Stämmen, die analysiert wurden, vor allem aber in ihren unterschiedlichen Methoden, die angewendet wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen Stämme nicht signifikant voneinander unterscheiden. Auch bei Yildiz et al. (2007) konnten in Bezug auf die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen keine großen Unterschiede zwischen den

verschiedenen Stämmen ausgemacht werden. Die Werte lagen zwischen $1,6 \% \pm 0,2 \%$ und $4,8 \% \pm 1,3 \%$ (Yildiz et al. 2007).

Man kann somit festhalten, dass die Zahl der DNA-Strangbrüche in den Spermien der Maus sehr niedrig ist. Im Vergleich zum Menschen, bei dem die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen im Durchschnitt zwischen 8% und 19% liegt (Boxmeer et al. 2009, El-Melegy und Ali 2011, Erenpreiss et al. 2008, Pelliccione et al. 2011), spielen sie bei der Maus nur eine untergeordnete Rolle. Aus diesem Grund wurde in weiteren Untersuchungen analysiert, ob das Ausknocken Keimzell-spezifischer Gene die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen erhöht. Dies ist aber nicht der Fall (Vgl. 4.3)

4.3 Der Zusammenhang zwischen Fehlern in der Protaminierung und DNA-Strangbrüchen

Außerdem sollte in dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, inwieweit die Protaminierung einen Einfluss auf die Entstehung von DNA-Strangbrüchen hat.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl von Spermien mit einer fehlerhaften Protaminierung in Mäusen sehr gering ist ($0,47 \% \pm 0,21 \%$ bis $2,19 \% \pm 0,93 \%$ bei Anilinblau bzw. $0,86 \% \pm 0,62 \%$ bis $1,88 \% \pm 1,05 \%$ bei CMA3). Außerdem wurde eine positive und signifikante Korrelation zwischen der Anzahl von DNA-Strangbrüchen und der Anzahl von Spermien mit einer fehlerhaften Protaminierung nachgewiesen. Eine Korrelation zwischen beiden Werten konnte auch von Piña-Guzmán und Mitarbeitern nachgewiesen werden (Piña-Guzmán et al. 2006).

Bei der Untersuchung von Mäusen aus multiplen Knockout-Linien wurde in dieser Arbeit jedoch gezeigt, dass sich die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen bis zum Ausknocken von fünf Keimzell-spezifischen Genen (DKO23) nicht signifikant verändert. Erst in einer Linie mit sechs ausgeknockten Genen (DKO34) ist ein signifikanter Unterschied zu den anderen Mäusen erkennbar. Bei der Protaminierung kann schon bei einer geringeren Anzahl von ausgeknockten Genen, bereits bei vieren (DKO19), ein signifikanter Anstieg an Fehlern in der Protaminierung im Vergleich zu den anderen Linien gefunden werden. Insgesamt nimmt die Anzahl der Spermien mit Fehlern in der Protaminierung deutlich stärker zu als die mit DNA-Strangbrüchen.

Es ist bemerkenswert, dass die Häufigkeit von Fehlern in der Protaminierung parallel zu der Anzahl von ausgeknockten Genen ansteigt, wo doch nur zwei (*Tnp2* und *Hist1h1t*) der

insgesamt bis zu sechs ausgeknockten Gene direkt etwas mit der Protaminierung zu tun haben.

Möglich wäre, dass bei den ausgeknockten Genen verschiedene Interaktionspartner eine wichtige Rolle für den Anstieg der Protaminierungsfehler spielen. *Tnp2* (Transitions Protein 2) und *Hist1h1t* (Histon H1t) werden bei den Mäusen mit drei (DKO12) ausgeknockten Genen deletiert. Ein deutlicher Effekt ist aber erst ab dem Ausknocken von vier Keimzell-spezifischen Genen (DKO19) sichtbar. Hier wäre eine weiterführende Suche nach den möglichen Interaktionspartnern sinnvoll, um diesen Prozess näher zu untersuchen und zu verstehen.

4.4 Einfluss des Alters auf die DNA-Strangbrüche in den Spermien

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Auswirkung des Alters auf die Anzahl der apoptotischen Keimzellen in den Hoden und der Spermien mit DNA-Strangbrüchen untersucht.

Bei der Untersuchung der Hoden von jungen (drei Monate) und von alten Mäusen (dreizehn Monate) konnte gezeigt werden, dass die jungen Männchen signifikant mehr apoptotische Keimzellen pro Tubulus aufweisen als die alten. Bei den untersuchten Spermien der jungen und alten Männchen konnte sowohl in Bezug auf die Protaminierung als auch auf die Anzahl der DNA-Strangbrüche kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

In einer Studie von Brinkworth und Schmid (2003) wurden auch weniger apoptotische Keimzellen in alten MF-1-Mäusen (12 Monate) im Vergleich zu jungen MF-1-Mäusen (2 Monate) gefunden. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Brinkworth und Schmid 2003).

Bei der Untersuchung von humanen Proben kann man verschiedene Ergebnisse finden: Es gibt sowohl Studien, die einen signifikant höheren Anteil an Spermien mit DNA-Strangbrüchen bei älteren Männern feststellen konnten (Vagnini et al. 2007, Horta et al. 2011), als auch solche, die diesen Unterschied nicht gefunden haben (Winkle et al. 2009, Colin et al. 2010, Brahem et al. 2011b). Bei den Untersuchungen von Ratten erhält man wiederum andere Ergebnisse. In einer Studie aus dem Jahre 2011 wurde gezeigt, dass die Anzahl von apoptotischen Keimzellen in den Testis von älteren Männchen (140 Tage) signifikant höher war als bei jungen (66 Tage) (Favareto et al. 2011). In einer weiteren Studie mit Ratten (4 und 21 Monate alt) konnten bei den 4 Monate alten Männchen signifikant mehr

Fehler in der Protaminierung festgestellt werden als bei den älteren. Die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen unterschied sich hingegen nicht (Zubkova et al. 2005).

Insgesamt lassen sich also sehr stark voneinander abweichende Ergebnisse finden. In einer Studie haben die Autoren humane Spermien untersucht und analysiert, wie viele Spermien sich in Apoptose befinden und wie viele Spermien DNA-Strangbrüche aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Alter mehr Spermien mit DNA-Strangbrüchen und weniger apoptotische Spermien vorhanden sind (Singh et al. 2003). Dieser Befund unterstützt unser Ergebnis von den untersuchten Mäusen, nämlich dass mit dem Alter die Eliminierung von beschädigten Spermien durch Apoptose weniger effektiv wird.

Bei den jungen Individuen wird die Weiterentwicklung von defekten Spermatozyten mit DNA-Strangbrüchen zu reifen Spermien vermutlich verhindert. Ältere haben dieses Potential wahrscheinlich nicht mehr, so dass die Anzahl der apoptotischen Zellen ab- und die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen zunimmt (Singh et al. 2003). Die Anzahl der defekten Keimzellen in den Hoden müsste jedoch insgesamt steigen, da sich die Keimzellen im Laufe des Lebens immer wieder teilen und sich so immer weitere Fehler in die Replikation einschleichen (Singh et al. 2003, Harris et al. 2011, Templado et al. 2011).

Da in der vorliegenden Arbeit bei den 13 Monate alten Mäusen keine erhöhte Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen gefunden werden konnte, könnte man die Versuche wiederholen und dabei deutlich ältere Männchen untersuchen. Denn gerade der Vergleich zwischen Mäusen und Menschen ist schwierig, da der Mensch deutlich älter wird als die Maus und hierdurch der oben beschriebene Effekt bei ihm sichtlich stärker ausgeprägt sein kann.

4.5 Untersuchung von *Pxt1*^{-/-}-Mäusen

Zusätzlich zu dem Einfluss des Alters auf die Apoptose und die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen sollte untersucht werden, wie sich beide Faktoren verhalten, wenn ein proapoptotisches Gen ausgeknockt wird. Hierfür wurden *Pxt1*-Knockout-Mäuse untersucht. Das in männlichen Keimzellen exprimierte *Pxt1*-Gen enthält eine BH3-Domäne, welche proapoptotisch wirkt (Kaczmarek 2009, Kaczmarek et al. 2011).

Es konnte mit Hilfe von TUNEL gezeigt werden, dass die Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen in den *Pxt1*^{-/-}-Mäusen signifikant höher war als in den 129/Sv-Mäusen (1,13 % ± 0,33 % bzw. 0,56 % ± 0,02 %). Zusätzlich wurden die Hoden von drei bis vier

Monate alten *Pxt1*^{-/-}- und 129/Sv-Männchen untersucht und die Anzahl der apoptotischen Keimzellen analysiert. Hier zeigte sich, dass sich die Tiere mit $0,67 \pm 0,28$ (129/Sv) und $0,54 \pm 0,21$ (*Pxt1*^{-/-}) apoptotischen Zellen pro Tubulus nicht signifikant voneinander unterscheiden. Auch in der Vollständigkeit der Protaminierung konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Spermatogenese bei den *Pxt1*-Knockout-Mäusen unter physiologischen Bedingungen ganz normal verläuft. Es stellte sich die Frage, inwiefern sich 129/Sv- und *Pxt1*^{-/-}-Mäuse in der Induzierbarkeit von DNA-Strangbrüchen unterscheiden. Hier konnte im Laufe der Induktion kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Mäusen gezeigt werden. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass das *Pxt1*-Gen keine Rolle in der Resistenz gegen DNase I spielt. Man kann aber nicht ausschließen, dass die Spermien von *Pxt1*-defizienten Mäusen auf andere Substanzen stärker reagieren könnten. Aus diesem Grund wäre es eine Möglichkeit, in einem erneuten Versuch die DNA-Strangbrüche durch z. B. äußere Einwirkungen oder Medikamente noch in der Maus, also in vivo, zu induzieren. Möglich wäre, dass im Laufe der Zeit ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen erkennbar würde.

4.6 Suche nach einem geeigneten Tiermodell

Bei der Untersuchung der verschiedenen Mäuse konnte gezeigt werden, dass die Zahl der Spermien mit fragmentierter DNA sowohl in Wildtyp- als auch in verschiedenen Knockout-Mäusen sehr gering ist. Die Protaminierung ist in den Wildtyp-Mäusen und den *Pxt1*-Knockout-Mäusen weitestgehend vollständig. Nur in den multiplen Knockout-Mäusen (mit vier oder mehr ausgeknockten Genen) steigen die Fehler in der Protaminierung mit der zunehmenden Anzahl von ausgeknockten Genen an. Gerade die Studien mit Mäusen dienen dazu, Fragen, die sich in Bezug auf den Menschen stellen, zu beantworten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die Maus aufgrund ihrer geringen Anzahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen, die unter 2 % liegt, nicht mit dem Menschen vergleichbar ist. Dieser weist im Durchschnitt deutlich höhere Werte auf: Zwischen 8 % und 19 % in fertilen Männern (Boxmeer et al. 2009, El-Melegy und Ali 2011, Erenpreiss et al. 2008, Pelliccione et al. 2011). Je nach Studie lassen sich zwischen $6,3 \% \pm 1,8 \%$ und $32,9 \% \pm 8,2 \%$ Spermien mit Fehlern in der Protaminierung finden (Plastira et al. 2007, Kazerooni et al. 2009, De Iuliis et al. 2009, Hammadeh et al. 2010). Die Maus ist also kein geeignetes Modell, das Rückschlüsse auf den Menschen gestattet.

In verschiedenen Studien wurden immer wieder unterschiedliche Tiere untersucht, um die Themenkomplexe der Strangbrüche und der Infertilität zu bearbeiten (Peris et al. 2007, Gosálvez et al. 2008, Del Valle et al. 2010, Abbasi et al. 2011, Casey et al. 2011, Gosálvez et al. 2011, Whitaker et al. 2012). Um ein besseres Modell zu finden, wurden in dieser Arbeit verschiedene Tiere untersucht: Ratten, Kaninchen, Schafe, Ziegen, Schweine und Rhesusaffen. Es stellte sich heraus, dass in den Spermien der Tiere ebenfalls nur eine geringe Zahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen gefunden werden kann. Auch die Zahl der Spermien mit einer unvollständigen Protaminierung fiel hier gering aus. Eine Ausnahme bildete der Rhesusaffe. Bei ihm wurden im Vergleich zu den übrigen Spezies mit Anilinblau signifikant mehr Spermien mit einer unvollständigen Protaminierung gefunden. Zusätzlich war die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen deutlich - wenn auch nicht signifikant - höher als bei den übrigen Tieren.

In einer ähnlichen Studie von Gosálvez et al. (2011) wurden insgesamt elf verschiedene Tierarten mit Halosperm auf die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen untersucht (hierbei werden die DNA-Strangbrüche mit Hilfe so genannter Halos (Lichthof) dargestellt). Genauso wie in der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen unter anderem an Hasen, Ziegen, Schafen und Schweinen durchgeführt. Zusätzlich wurden noch Esel, Pferde, Holstein-Rinder, Stiere, Nashörner, Weißwedelhirsche und Koalas untersucht. Insgesamt konnte diese Studie zeigen, dass die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen bei den Schweinen bei etwa 4 %, bei den Schafen bei etwa 1 %, bei den Ziegen bei etwa 7 % und bei den Hasen bei etwa 8 % lag. Die anderen Tiere lagen bei ca. 18 % (Esel), ca. 16 % (Pferd), ca. 6 % (Holstein-Rind), ca. 4 % (Stier), ca. 6 % (Nashorn), ca. 5 % (Weißwedelhirsch) und ca. 6 % (Koala) (Gosálvez et al. 2011). Die Unterschiede zu dem Ergebnis in der vorliegenden Arbeit sind auf die unterschiedlichen Methoden zurückzuführen. Auch in anderen Arbeiten variierten die Ergebnisse je nach angewandeter Methode. Desgleichen konnten mit derselben Methode deutlich voneinander abweichende Werte erhoben werden. So wurden z. B. bei Schweinen in zwei Studien Werte zwischen $29,5 \% \pm 2,3 \%$ (COMET) (Whitaker et al. 2012) und $59,3 \% \pm 6,4 \%$ (COMET) (Casey et al. 2011) gefunden. Bei Schafen hingegen ermittelte eine Studie Werte etwa zwischen $6 \% \pm 1 \%$ und $12 \% \pm 2 \%$ - je nach benutztem Medium (TUNEL) (Del Valle et al. 2010). Eine andere zeigte einen Durchschnittswert von $1,0 \% \pm 1,5 \%$ (SCSA) (Peris et al. 2007). In den Spermien der Ziege wurde in etwa 4 % der Spermien fragmentierte DNA gefunden (COMET) (Gosálvez et al. 2008) und in den Spermien der Ratte in etwa 5 % (AOT) (Abbasi et al. 2011).

Es ist also alles in allem schwierig, die Studien miteinander zu vergleichen. Nur auf die vorliegende Arbeit bezogen würde sich am ehesten der Rhesusaffe als Modell eignen. Nach eingehender Literaturrecherche kristallisiert sich aber keine Spezies heraus, die zuverlässig mit dem Menschen vergleichbar ist.

5 Zusammenfassung

Der Grund für eine ungewollte Kinderlosigkeit liegt zu etwa 30 % beim Mann (Taubert und Licht 2007). In etwa 10-15 % der infertilen Paare ist die Infertilität genetisch bedingt (Ferlin et al. 2007a, Krausz 2011). In den letzten Jahren haben die DNA-Strangbrüche in den Spermien eine immer wichtigere Rolle in der Infertilitätsdiagnostik und der anschließenden künstlichen Befruchtung eingenommen. In vielen Laboren gehört ihre Untersuchung inzwischen zu den Standards, wenn es darum geht, die Infertilität des Mannes besser zu erfassen. Betrachtet man die aktuelle Studienlage, können immer mehr Untersuchungen einen direkten Zusammenhang zwischen DNA-Strangbrüchen und der Infertilität und dem Outcome der künstlichen Befruchtung (IUI und IVF) zeigen (Sergerie et al. 2005, Erenpreiss et al. 2008, Giwercman et al. 2010, Simon et al. 2010, Zini 2011, Brahem et al. 2011a, Beshay und Bukulmez 2012,). Ein Zusammenhang zwischen DNA-Strangbrüchen und dem Ergebnis einer ICSI hingegen ist eher fraglich (Høst et al 2000, Morris et al. 2002, Benchaib et al. 2003, Lin et al. 2008, Simon et al. 2010, Speyer et al. 2010, Zini 2011, Sadeghi et al. 2011, Thomson et al. 2011).

Im Vergleich zu den Ergebnissen beim Menschen zeigen die Mäuse deutlich weniger Spermien, in denen die DNA fragmentiert ist. Nach eingehender Analyse des in der Literatur dokumentierten Forschungsstandes und dem Vergleich mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen zeigt sich, dass die Werte, die in den Studien zu finden sind, insgesamt schwer miteinander vergleichbar sind. Diese Problematik wurde auch im Review von Aitken et al. erfasst (Aitken et al. 2009). Die Untersuchung der DNA-Strangbrüche wurde jedoch von der WHO 2010 als Standarduntersuchung der humanen Spermien empfohlen (WHO 2010). Es müssten aber insgesamt standardisierte Messmethoden entwickelt werden.

Die Untersuchung verschiedener Knockout-Mäuse zeigte eine deutliche Zunahme der inkompletten Protaminierung, jedoch nur eine sehr geringe Zunahme der DNA-Strangbrüche in den Spermien mit der steigenden Zahl an ausgeknockten Genen. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Fehler in der Protaminierung und die DNA-Strangbrüche miteinander positiv korrelieren (Piña-Guzmán et al. 2006), stiegen sie nicht in der gleichen Intensität an. Weiter konnte dargelegt werden, dass die Fehler in der Protaminierung kontinuierlich ansteigen, obwohl nur zwei der insgesamt sechs ausgeknockten Gene direkt auf die Protaminierung einwirken. Es besteht also der Verdacht, dass die übrigen ausgeknockten Gene über

verschiedene Mechanismen zusätzlich die Protaminierung beeinflussen. Um diese Hypothese zu verifizieren, wäre in Zukunft die Suche nach den genauen Interaktionen sinnvoll.

Der Vergleich von alten und jungen Mäusen ergab lediglich signifikant mehr apoptotische Keimzellen in den Testes junger Männchen im Vergleich zu älteren Männchen. Bezüglich der Zahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen konnte zwischen den alten und jungen Mäusen kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Studie von Singh et al. (2003). Hierbei wurden junge und alte Männer untersucht und herausgefunden, dass die Anzahl von apoptotischen Spermien mit dem Alter sinkt, die der Spermien mit DNA-Strangbrüchen hingegen steigt. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass junge Individuen ihre defekten Keimzellen eher in Apoptose schicken können als ältere und somit insgesamt weniger DNA-Strangbrüche aufweisen (Singh et al. 2003). Da die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen bei der Maus so gering ausfällt, konnte dieser Effekt bei den 13 Monate alten Männchen nur zum Teil gezeigt werden. Dieser Versuch sollte mit noch älteren Mäusen wiederholt werden.

Bei der Untersuchung von *Pxt1*-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese sich in Bezug auf die Spermien mit fragmentierter DNA von den 129/Sv-Wildtyp-Mäusen unterscheiden. Eine Induktion von DNA-Strangbrüchen durch DNase I zeigte jedoch keinen Unterschied. Das *Pxt1*-Gen ist vermutlich für die physiologische Elimination der defekten Spermien von Bedeutung. Bei der Induktion der DNA-Strangbrüche mit DNase I scheint dieses jedoch keinen Einfluss zu nehmen. Aus diesem Grund wären hier weitere Untersuchungen mit anderen Induktionsmethoden, die länger und auch in vivo auf die Keimzellen einwirken, sinnvoll, um genauer die Bedeutung des *Pxt1*-Gens in diesem Zusammenhang zu untersuchen.

Letztendlich und abschließend wurde festgestellt, dass sich die Maus nicht als Modell eignet, um die Bedeutung von DNA-Strangbrüchen in Spermien im Bezug auf die Fruchtbarkeit zu untersuchen. Die Maus hat im Vergleich zum Menschen (zwischen 8 % und 19 % DNA-Strangbrüchen bei fertilen Männern (Boxmeer et al. 2009, El-Melegy und Ali 2011, Erenpreiss et al. 2008, Pelliccione et al. 2011)) eine sehr niedrige Zahl von Spermien mit DNA-Strangbrüchen (< 2 %). Deswegen ist die Suche nach einem anderen Tiermodell nötig. Allerdings fielen die Ergebnisse bei den eigenen und bei den in der Literatur gefundenen Tierarten sehr unterschiedlich aus. Unter den in dieser Arbeit untersuchten Tierarten ließ sich kein zuverlässiges Modell finden, welches zufrieden stellend mit dem Menschen vergleichbar ist.

6 Literaturverzeichnis

Abbasi M, Alizadeh R, Abolhassani F, Amidi F, Ragerdi KI, Fazelpour S, Hoshino Y, Sato E, Dehpour AR (2011): Effect of aminoguanidine in sperm DNA fragmentation in varicocelized rats: role of nitric oxide. *Reprod Sci* 18: 545–550.

Adham IM, Nayernia K, Engel W (1997): Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod Dev* 46: 370–376.

Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Göttges E, Topaloglu O, Dixkens C, Holstein AF, Engel W (2001): Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod* 7: 513–520.

Adham IM, Eck TJ, Mierau K, Müller N, Sallam MA, Paprotta I, Schubert S, Hoyer-Fender S, Engel W (2005): Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice. *Mol Cell Biol* 25: 7657–7664.

Aitken RJ, De Iuliis GN (2010): On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 16: 3–13.

Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI (2009): Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32:46–56.

Bauer M, Leigh C, Peirce E, Breed WG (2005): Comparative study of sperm chromatin condensation in the excurrent ducts of the laboratory mouse *Mus musculus* and spinifex hopping mouse *Notomys alexis*. *Reprod Fertil Dev* 17: 611–616.

Benchab M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF (2003): Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 18: 1023–1028.

Beshay VE, Bukulmez O (2012): Sperm DNA damage: how relevant is it clinically? *Curr Opin Obstet Gynecol* 24: 172–179.

Bojesen A, Juul S, Gravholt CH (2003): Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 622–626.

Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE (1998): Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 352: 1172–1177.

Boxmeer JC, Smit M, Utomo E, Romijn JC, Eijkemans MJC, Lindemans J, Laven JSE, Macklon NS, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RPM (2009): Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertil Steril* 92: 548–556.

Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A (2011a): The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet* 28: 425–432.

Brahem S, Mehdi M, Landolsi H, Mougou S, Elghezal H, Saad A (2011b): Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology* 78: 792–796.

-
- Braun RE (2001): Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28: 10–12.
- Brinkworth MH, Schmid TE (2003): Effect of age on testicular germ cell apoptosis and sperm aneuploidy in MF-1 mice. *Teratog Carcinog Mutagen Suppl* 2: 103–109.
- Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Cooke HJ, Affara NA (1998): Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet* 7: 97–107.
- Casey SJ, Taupier R, Whitaker BD (2011): Effects of anti-lipid peroxidases on frozen-thawed boar spermatozoa. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47: 350–354.
- Castillo J, Simon L, de Mateo S, Lewis S, Oliva R (2010): Protamine/DNA Ratios and DNA Damage in Native and Density Gradient Centrifugated Sperm from Infertile Patients. *J Androl* 32: 324–32.
- Chai NN, Zhou H, Hernandez J, Najmabadi H, Bhasin S, Yen PH (1998): Structure and organization of the RBMY genes on the human Y chromosome: transposition and amplification of an ancestral autosomal hnRNPG gene. *Genomics* 49: 283–289.
- Chandley AC, Edmond P, Christie S, Gowans L, Fletcher J, Frackiewicz A, Newton M (1975): Cytogenetics and infertility in man. I. Karyotype and seminal analysis: results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. *Ann Hum Genet* 39: 231–254.
- Colin A, Barroso G, Gómez-López N, Duran EH, Oehninger S (2010): The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril* 94: 2609–2614.
- Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN (2008): Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 89: 823–831.
- Cram DS, Osborne E, McLachlan RI (2006): Y Chromosome Microdeletions: Implications For Assisted Conception. *Med J Aust* 185: 433–434.
- De Braekeleer M, Dao TN (1991): Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6: 245–250.
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ (2009): DNA Damage in Human Spermatozoa Is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress. *Biol Reprod* 81: 517–524.
- Del Valle I, Mendoza N, Casao A, Cebrián-Pérez JA, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T (2010): Significance of non-conventional parameters in the evaluation of cooling-induced damage to ram spermatozoa diluted in three different media. *Reprod Domest Anim* 45: e260–268.
- Drabent B, Saftig P, Bode C, Doenecke D (2000): Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochem. Cell Biol* 113: 433–442.
- Elliott DJ, Cooke HJ (1997): The molecular genetics of male infertility. *Bioessays* 19: 801–809.

El-Melegy NT, Ali MEM. (2011): Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *Int Braz J Urol* 37: 495–506.

Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A (2008): Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 10: 786–790.

Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A (2011): An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics (Sao Paulo)* 66: 691–700.

Favareto APA, Fernandez CDB, da Silva DA, Anselmo-Franci JA, Kempinas WDG (2011): Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with Cisplatin at peri-puberty. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109: 85–96.

Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C (2007a): Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 762–770.

Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C (2007b): Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 14: 734–745.

Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Alvarez P, Hourcade JdeD, Fonseca FR de, et al. (2008): Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA-Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring. *Biol Reprod* 78: 761–772.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, et al. (2004): Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 19: 1409–1417.

Geisler S : Molekulare und phänotypische Analyse bei Tep22-defizienten Mäusen. Biol. Dipl. Göttingen 2004

Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, Karakitsios K, Mantzavinos T, Giotitsas N, Loutradis D, Dimitriadis F, Saito M, Miyagawa I, et al. (2006): Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl* 8: 643–673.

Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, Rylander L (2010): Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 33: e221–e227.

Gosálvez J, Gosálbez A, Arroyo F, Fernández JL, López-Fernández C (2008): Assessing sperm DNA fragmentation in the field: an adaptation of sperm chromatin dispersion technology. *Biotech Histochem* 83: 247–252.

Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, Holt WV (2011): Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev* 78: 951–961.

Grzmil P, Burfeind C, Preuss T, Dixkens C, Wolf S, Engel W, Burfeind P (2007): The putative peroxisomal gene *Pxt1* is exclusively expressed in the testis. *Cytogenet Genome Res* 119: 74–82.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, et al. (2001): Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345: 1388–1393.

Hammadeh ME, Hamad MF, Montenarh M, Fischer-Hammadeh C (2010): Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Hum Reprod* 25: 2708–2720.

Harris ID, Fronczak C, Roth L, Meacham RB (2011): Fertility and the Aging Male. *Rev Urol* 13: e184–e190.

Horta F, Madariaga M, García A, Hartel S, Smith R (2011): Association of age with sperm DNA fragmentation. *Rev Med Chil* 139: 306–312.

Høst E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S (2000): The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79: 559–563.

Jones MH, Furlong RA, Burkin H, Chalmers IJ, Brown GM, Khwaja O, Affara NA (1996): The *Drosophila* developmental gene *fat facets* has a human homologue in Xp11.4 which escapes X-inactivation and has related sequences on Yq11.2. *Hum Mol Genet* 5, 1695–1701.

Kaczmarek K: On the Functional Analysis of Murine Peroxisomal. Biol. Diss. Göttingen 2009

Kaczmarek K, Studencka M, Meinhardt A, Wiczerzak K, Thoms S, Engel W, Grzmil P (2011): Overexpression of peroxisomal testis specific 1 protein induces germ cell apoptosis and leads to infertility in male mice. *Mol Biol Cell* 22: 1766-79.

Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffaripasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J (2009): Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet* 26: 591–596.

Kim ED, Barqawi AZ, Seo JT, Meacham RB (2002): Apoptosis: its importance in spermatogenic dysfunction. *Urol Clin North Am* 29, 755–765, vii.

Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F (1942): Syndrome Characterized by Gynecomastia, Aspermatogenesis without A-Leydigism, and Increased Excretion of Follicle-Stimulating Hormone. *J Clin Endocrinol* 2: 615 –627.

Krausz C (2011): Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25: 271–285.

Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K (2000): Prognostic value of Y deletion analysis. *Hum Reprod* 15: 1431 –1434.

Lahn BT, Page DC (1997): Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278: 675–680.

Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E (2004): Klinefelter's syndrome. *Lancet* 364: 273–283.

Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G (2008): DNA Damage Response During Chromatin Remodeling in Elongating Spermatids of Mice. *Biol Reprod* 78: 324–332.

Libman J, Gabriel MS, Sairam MR, Zini A (2010): Catalase can protect spermatozoa of FSH receptor knock-out mice against oxidant-induced DNA damage in vitro. *Int J Androl* 33: 818–822.

Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM (2008): Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 90: 352–359.

Luddi A, Margollicci M, Gambera L, Serafini F, Cioni M, De Leo V, Balestri P, Piomboni P (2009): Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y. *N Engl J Med* 360: 881–885.

Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K (1993): A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 75: 1287–1295.

Mannan AU, Nayernia K, Mueller C, Burfeind P, Adham IM, Engel W (2003): Male mice lacking the Theg (testicular haploid expressed gene) protein undergo normal spermatogenesis and are fertile. *Biol Reprod* 69: 788–796.

Matzuk M M, Lamb D J (2008): The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 14: 1197–1213.

Morris ID, Iltott S, Dixon L, Brison DR (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. *Hum Reprod* 17: 990–998.

Moskowitz SM, Chmiel JF, Stern DL, Cheng E, Cutting GC: *CFTR*-Related Disorders Includes: Cystic Fibrosis (CF, Mucoviscidosis) and Congenital Absence of the Vas Deferens (CAVD) (GeneReviews; hrsg von Pagon RA, Bird TD, Dolan CR und anderen); University of Washington, Seattle 2001/2008

Nayernia K, Adham IM, Shamsadin R, Müller C, Sancken U, Engel W (2002): Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility. *Mol Hum Reprod* 8: 434–440.

O’Flynn O’Brien KL, Varghese AC, Agarwal A (2010): The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* 93: 1–12.

Okun E, Dikshtein Y, Carmely A, Saida H, Frei G, Sela BA, Varshavsky L, Ofir A, Levy E, Albeck M, et al. (2007): The organotellurium compound ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o’)tellurate reacts with homocysteine to form homocystine and decreases homocysteine levels in hyperhomocysteinemic mice. *FEBS J* 274: 3159–3170.

Oliva R (2006): Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12: 417–435.

Oliveira H, Spanò M, Santos C, Pereira MdeL (2009): Lead chloride affects sperm motility and acrosome reaction in mice: lead affects mice sperm motility and acrosome reaction. *Cell Biol Toxicol* 25: 341–353.

Pelliccione F, d' Angeli A, Cinque B, Falone S, Micillo A, Francavilla F, Amicarelli F, Gandini L, Francavilla S (2011): Activation of the immune system and sperm DNA fragmentation are associated with idiopathic oligoasthenoteratospermia in men with couple subfertility. *Fertil Steril* 95: 2676–2679.e1–3.

Pérez-Crespo M, Moreira P, Pintado B, Gutiérrez-Adán A (2008): Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. *J Androl* 29: 47–54.

Peris SI, Bilodeau JF, Dufour , Bailey JL (2007): Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 74: 878–892.

Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Rojas-García AE, Urióstegui-Acosta M, Quintanilla-Vega B (2006): Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 216–224.

Plastira K, Msaouel P, Angelopoulou R, Zanioti K, Plastiras A, Pothos A, Bolaris S, Papanastasiou N, Mantas D (2007): The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 24: 437–443.

Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O (1995): Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 10: 383–393.

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059–1065.

Sadeghi MR, Lakpour N, Heidari-Vala H, Hodjat M, Amirjannati N, Hossaini Jadda H, Binaafar S, Akhondi MM (2011): Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia. *Rom J Morphol Embryol* 52: 645–651.

Sakkas D, Alvarez JG (2010): Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93: 1027–1036.

Saxena R, de Vries JW, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, Ma P, Chen E, Hoovers JM, Page DC (2000): Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics* 67: 256–267.

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G (2005): Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 20: 3446–3451.

Shamsi MB, Kumar R, Dada R (2008): Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 127: 115–123.

Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SEM. (2010): Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* 25: 1594–1608.

Singh NP, Muller CH, Berger RE (2003): Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 80: 1420–1430.

Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P (2010): Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum Reprod* 25: 1609–1618.

Stauber M: Sterilität und Infertilität; in :Gynäkologie und Geburtshilfe, hrsg. von Stauber M und Weyerstahl T; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007, 429- 454

Strom CM, Crossley B, Buller-Buerkle A, Jarvis M, Quan F, Peng M, Muralidharan K, Pratt V, Redman JB, Sun W (2011): Cystic fibrosis testing 8 years on: Lessons learned from carrier screening and sequencing analysis. *Genet Med* 13: 166–172.

Tariverdian G, Buselmaier W: Humangenetik, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2006

Taubert HD, Licht P: Sterilität und Infertilität; in :Gynäkologie und Geburtshilfe, hrsg von Schmidt-Matthiesen H und Wallwiener DFK; F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart 2007, 124-139

Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH (2009): Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 91: 1119–1126.

Templado C, Donate A, Giraldo J, Bosch M, Estop A (2011): Advanced age increases chromosome structural abnormalities in human spermatozoa. *Eur J Hum Genet* 19: 145–151.

The Cystic Fibrosis Mutation Database, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, 2010

Thomson LK, Zieschang JA, Clark AM (2011): Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 96: 843–847.

Tiepolo L, Zuffardi O (1976): Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34: 119–124.

Vagnini L, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JBA, Franco JG Jr (2007): The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online* 15: 514–519.

Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (1996): Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 11 Suppl 4: 1–24; discussion 25–26.

Venkatesh S, Kumar R, Deka D, Deecaraman M, Dada R (2011): Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men. *Syst Biol Reprod Med.* 57: 124–132.

Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, et al. (1996): Human Y Chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5: 933–943.

Whitaker B, Casey S, Taupier R (2012): N-acetyl-l-cysteine Supplementation Improves Boar Spermatozoa Characteristics and Subsequent Fertilization and Embryonic Development. *Reprod Domest Anim* 47: 263–268.

WHO: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. WHO, Genf 2010

Wikström AM, Dunkel L (2008): Testicular function in Klinefelter syndrome. *Horm Res* 69, 317–326.

Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N (2009): The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet* 26: 41–46.

Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L, McKerlie C (2007) Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction* 133: 585–595.

Zini A (2011): Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med* 57: 78–85.

Zubkova EV, Wade M, Robaire B (2005): Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil Steril* 84 Suppl 2, 1191–1198.