

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Direktor: Prof. Dr. Christian Rube

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Auswirkungen einer fraktionierten Niedrigdosis- bestrahlung auf murines Hodengewebe**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines*

*Doktors der theoretischen Medizin*

*der Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

**2014**

vorgelegt von: Angelika Grewenig, M.Sc.

geboren am: 04.11.1987 in Neunkirchen/Saar



Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Claudia E. Rube

Vorsitzender:

Tag der mündlichen Prüfung:



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung/Summary</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1	Ionisierende Strahlung	5
2.2	DNA-Reparatur	5
2.2.1	Homologe Rekombination (HR)	6
2.2.2	Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)	7
2.2.3	p53 bindendes Protein 1 (53BP1) als Marker für DSBs	8
2.3	Der murine Hoden	10
2.3.1	Morphologie und Spermatogenese	10
2.3.2	Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) als Marker für SSCs	13
2.3.3	DNA-Reparatur und Strahlenempfindlichkeit männlicher Keimzellen	13
2.4	Zielsetzung der Arbeit	15
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1	Chemikalien	17
3.2	Verwendete Antikörper	18
3.2.1	Primärantikörper	18
3.2.2	Sekundärantikörper	18
3.3	Versuchstiere	19
3.4	Fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung	19
3.5	Gewebepräparation	20
3.6	Färbungen	20
3.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	20
3.6.2	Immunfluoreszenzfärbung	21
3.7	Mikroskopie	22
3.7.1	Bestimmung der Querschnittsfläche von Tubuli im Hodengewebe	22
3.7.2	Quantifizierung der SSCs, der Proliferation und der Apoptose anhand von Markerproteinen	23
3.7.3	Quantifizierung der 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs	24
3.8	Statistische Auswertung	24
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
4.1	Bestimmung der Tubulusquerschnittsfläche	25
4.2	Untersuchung der SSCs, der Proliferation und der Apoptose anhand von Markerproteinen	27
4.2.1	Identifizierung und Quantifizierung der SSCs anhand des PLZF-Markerproteins	27
4.2.2	Untersuchung der Proliferation anhand des Ki67-Markerproteins	29
4.2.3	Untersuchung der Apoptose anhand des PARP1-Markerproteins	31
4.3	Untersuchung der DNA-Reparatur mittels 53BP1	33
4.4	Regeneration nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung	36

---

4.4.1	Bestimmung der Tubulusquerschnittsfläche	36
4.4.2	Identifizierung und Quantifizierung der SSCs anhand des PLZF-Markerproteins	37
4.4.3	Untersuchung der Proliferation anhand des Ki67-Markerproteins	37
4.4.4	Quantifizierung der residualen 53BP1-Foci in SSCs	37
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
5.1	Auswirkungen einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf murines Hodengewebe	41
5.2	Regeneration bestrahlten Hodengewebes nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung	46
<b>6</b>	<b>Verzeichnisse</b>	<b>49</b>
6.1	Literaturverzeichnis	49
6.2	Abkürzungsverzeichnis	59
6.3	Abbildungsverzeichnis	61
6.4	Tabellenverzeichnis	62
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>63</b>

# 1 Zusammenfassung/Summary

Spermatogonische Stammzellen sind die Basis der Spermatogenese, welche mit mitotischen Teilungen der Stammzellen beginnt. Zum Erhalt ihrer genetischen Integrität müssen die für die Fortpflanzung essentiellen Stammzellen intakte, effektive Mechanismen zur Reparatur von DNA-Schäden aufweisen. Während einer klinischen Strahlentherapie können durch die ionisierende Strahlung verschiedene DNA-Läsionen induziert werden, wobei DNA-Doppelstrangbrüche die schwerwiegendsten Schadensmuster darstellen. Über die Auswirkungen niedriger Strahlendosen, die während einer Bestrahlung auch gesundes Gewebe belasten, ist nur wenig bekannt. Zur Untersuchung der Auswirkungen einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf die Spermatogenese wurde Hodengewebe eines reparaturprofizienten sowie eines reparaturdefizienten Mausstamms analysiert. Im Rahmen einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung wurde das Gewebe *in vivo* 1, 10, 20, 30, 40 bzw. 50 Mal mit 10 bzw. 100 mGy je Fraktion bestrahlt und 24 bzw. 72 h nach der letzten Bestrahlung hinsichtlich verschiedener Aspekte untersucht. Reparaturdefiziente Mäuse wurden lediglich bis zu 20 Mal bestrahlt. Die Vermessung der Tubulusquerschnittsfläche 24 h nach der letzten Bestrahlung ließ eine deutliche Abnahme der Fläche mit zunehmender Bestrahlungsfraction erkennen. Damit zusammenhängend wurden die Anzahl der spermatogonischen Stammzellen und die der proliferierenden Zellen im Tubulusquerschnitt mit Hilfe von Markerproteinen untersucht, wobei das Protein *promyelocytic leukaemia zinc finger* (PLZF) als Markerprotein für die Stammzellen und Ki67 als Proliferationsmarker ausgewählt wurde. Die Anzahl der PLZF-positiven Stammzellen sowie die der proliferierenden Ki67-positiven Zellen nahm mit zunehmender Bestrahlungsfraction ab, was die Abnahme der Tubulusquerschnittsfläche mit verursacht. Die Anzahl apoptotischer Zellen, die mittels des Apoptosemarkers Poly-[ADP-Ribose]-Polymerase 1 nachgewiesen wurde, veränderte sich mit zunehmender Bestrahlungsfraction nur wenig. Die DNA-Reparatur wurde mittels des Markerproteins 53BP1 untersucht. Nach Bestrahlung nahm die Anzahl der 53BP1-Foci in PLZF-positiven Stammzellen im Tubulusquerschnitt zu. Zur Überprüfung der Regenerationsfähigkeit des murinen Hodengewebes wurden Analysen 35 und 70 Tage nach 50 x 100 mGy hinsichtlich der Tubulusquerschnittsfläche, der Anzahl der spermatogonischen Stammzellen und der proliferie-

renden Zellen sowie der Anzahl der 53BP1–Foci in Stammzellen durchgeführt. Es konnte eine Zunahme der Tubulusquerschnittsfläche, eine steigende Anzahl PLZF– und Ki67–positiver Zellen sowie eine Abnahme der 53BP1–Foci beobachtet werden, was die Regenerationsfähigkeit murinen Hodengewebes belegt.

## Effects of a protracted low dose radiation on murine testis tissue

Spermatogonial stem cells are the base of spermatogenesis which is initiated by mitotic divisions of the stem cells. To preserve their genetic integrity spermatogonial stem cells should have proper and effective DNA repair mechanisms. During clinical radiotherapy ionizing radiation induces different DNA lesions of which DNA double strand breaks are the most severe damage. The effects of low dose radiation on healthy tissue are only little investigated. To determine the impact of a protracted low dose radiation on spermatogenesis testes of repair proficient and deficient mice were analyzed during fractionated low dose *in vivo* radiation. Single doses of 10 and 100 mGy, respectively, were applied 10, 20, 30, 40 or 50 times and tissue was analyzed 24 and 72 h after the last fraction. Repair deficient mice were irradiated maximal 20 times. Both the number of *promyelocytic leukaemia zinc finger*–(PLZF)–positive stem cells and Ki67–positive proliferating cells per tubule decreased with increasing radiation doses, leading to the decline of the cross sectional area. The amount of apoptotic cells marked with antibodies specific for poly [ADP–ribose] polymerase 1 differed only slightly during fractionated low dose radiation. To investigate DNA repair in spermatogonial stem cells 53BP1 foci as a marker for DNA double strand breaks were quantified in tubule cross sections. In irradiated tissue the amount of 53BP1 foci per stem cell is higher than in control tissue. To validate the ability of testis tissue to regenerate after a protracted low dose irradiation the cross sectional area and the amount of spermatogonial stem cells, proliferating cells and 53BP1 foci in stem cells were analyzed 35 and 70 days after 50 x 100 mGy. In comparison to the data obtained 24 h after 50 x 100 mGy, we observed an increased cross sectional area, an elevated number of spermatogonial stem cells and proliferating cells and a decreased number of 53BP1 35 and 70 days after fractionated low dose radiation, reflecting the effective regeneration of testis tissue.



## 2 Einleitung

Jeder Organismus ist ständig ionisierender Strahlung ausgesetzt, wobei es neben natürlichen, auch künstliche Strahlenquellen gibt. Kosmische und terrestrische Strahlung sind Beispiele für natürlich vorkommende ionisierende Strahlen. In der Medizin werden künstliche Strahlenquellen verwendet, z. B. für diagnostische Untersuchungen oder im Rahmen von Strahlentherapien.

### 2.1 Ionisierende Strahlung

Es gibt zwei medizinisch relevante Arten ionisierender Strahlung: elektromagnetische Strahlen (Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung) und Teilchenstrahlung ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und Neutronenstrahlung). Ionisierende Strahlung ist dazu in der Lage, beim Durchdringen von Materie oder eines Organismus Ionen zu erzeugen. Durch diese sog. Ionisation kann es zu DNA-Schäden innerhalb einer Zelle kommen. Neben Basenschäden und DNA-Einzelstrangbrüchen (SSBs, von engl. *single strand breaks*) stellen DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs, von engl. *double strand breaks*), die falsch oder unrepariert lethal sein können, eine der schwerwiegendsten durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Schäden innerhalb einer Zelle dar (Olive, 1998; Löbrich und Jeggo, 2007; Jeggo und Löbrich, 2007; Kasten-Pisula *et al.*, 2009).

Strahleninduzierte DNA-Schäden können durch Aktivierung verschiedener Signalkaskaden Reparaturmechanismen, Zellzyklusarrest oder Apoptose einleiten (Jeggo *et al.*, 2011). Normalgewebe kann im Vergleich zu Tumorgewebe effizientere Mechanismen zur Reparatur von DNA-Schäden einleiten, was während einer Strahlentherapie zum Vorteil wird.

### 2.2 DNA-Reparatur

Zur Sicherung der Integrität des Genoms gibt es in einer Zelle verschiedene Mechanismen zur DNA-Reparatur. Die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ, von engl. *non-homologous end joining*) sind die beiden Hauptmechanismen zur Reparatur von DSBs (van Gent *et al.*, 2007; Mahaney *et al.*, 2009; Mazón *et al.*, 2010; Jeggo *et al.*, 2011). Die HR kann

nur stattfinden, wenn ein identisches Schwesterchromatid in der Zelle vorliegt und ist somit auf die späte S- und die G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus beschränkt. Die DNA-Reparatur mittels HR gilt als fehlerfrei, da die zu reparierende Sequenz direkt von dem entsprechenden identischen Schwesterchromatid abgelesen wird (Löbrich und Jeggo, 2007). Die NHEJ ist ein Mechanismus, der unabhängig von der Zellzyklusphase DSBs reparieren kann, vorwiegend aber in der G<sub>1</sub>- und der G<sub>0</sub>-Phase (Rothkamm und Löbrich, 2003).

### 2.2.1 Homologe Rekombination (HR)

Die HR stellt einen hoch konservierten und enorm wichtigen DNA-Reparaturmechanismus dar, der DSBs reparieren kann, die entweder während der Mitose und der Meiose auftreten oder (strahlen-)induziert sind. Neben der DSB-Reparatur ist die HR von großer Bedeutung für die Reparatur von Replikationsgabeln, für die Trennung meiotischer Chromosomen bei der ersten meiotischen Teilung und die Aufrechterhaltung von Telomeren (Sung und Klein, 2006). Mutationen von an der HR beteiligten Proteinen können den Reparaturmechanismus negativ beeinflussen und somit Organismen krebsanfällig werden lassen (Moynahan und Jasin, 2010), was die Relevanz der HR für die Erhaltung der Integrität des Genoms unterstreicht.

Wichtige beteiligte Proteine sind unter anderem der MRE11–RAD50–NBS1–(MRN)–Komplex, Replikationsprotein A (RPA), RAD51 und das Ataxia Teleangiektasie und Rad3–verbundene Protein (ATR; Abb. 2.1 A; Mazón *et al.*, 2010).

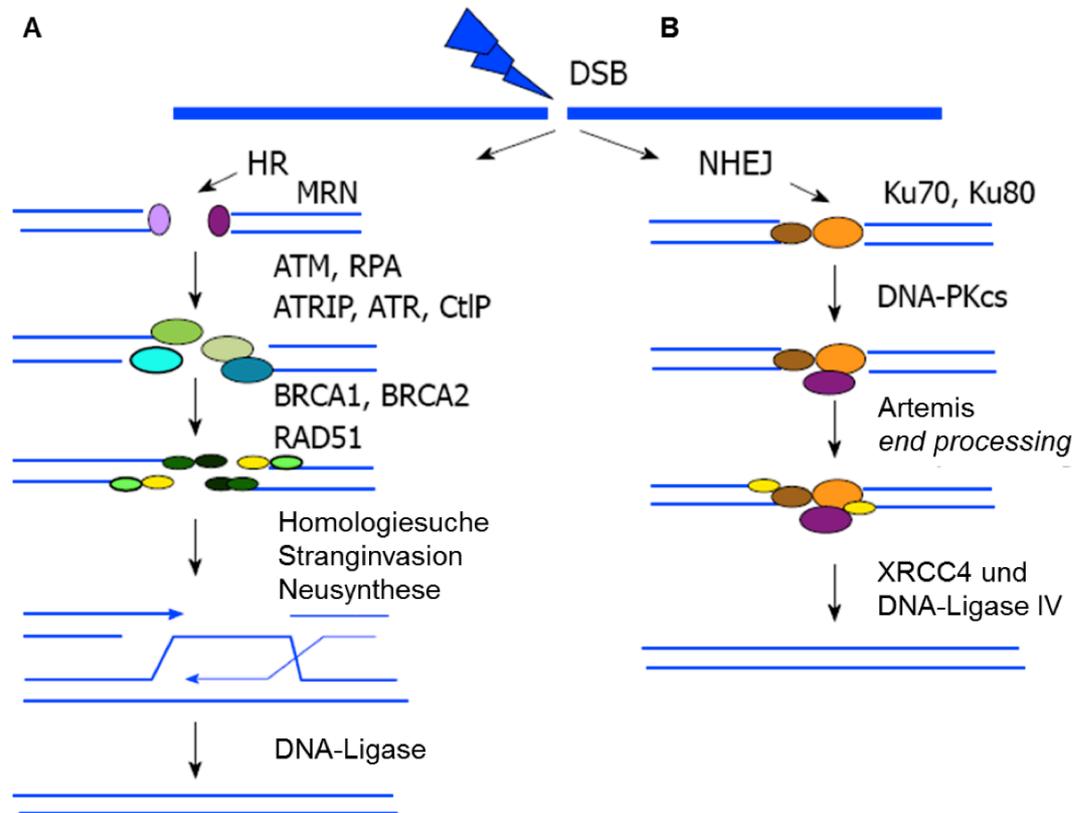
Der MRN–Komplex detektiert DSBs und aktiviert die ATM–Kinase (Abb. 2.1 A). Diese initiiert weitere Schritte der DNA–Reparatur. Die Formation von Einzelstrang–DNA (ssDNA, von engl. *single-strand DNA*) durch die Aktivität von CtIP (C–Terminus bindendes Protein 1–(CtBP)–interagierendes Protein) ist für die Endresektion vom 5' zum 3'–Ende der DNA erforderlich. RPA bindet an freie Enden von ssDNA und aktiviert ATR, um die HR zu erleichtern (Abb. 2.1 A). RAD51 ersetzt RPA, wodurch nach homologen DNA–Sequenzen gesucht und die Stranginvasion eingeleitet wird. Schließlich werden die DSBs durch Ligation des neu synthetisierten Sequenzstücks mittels einer DNA–Ligase repariert (Abb. 2.1 A).

## 2.2.2 Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)

Die NHEJ ist der Hauptreparaturweg in Säugerzellen (Rothkamm *et al.*, 2003). An der NHEJ sind verschiedene Proteine beteiligt, unter anderem Ku70 und Ku80, die katalytische Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase (DNA-PK<sub>cs</sub>, von engl. *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*), Artemis, *X-ray repair cross-complementing protein 4* (XRCC4) und die DNA-Ligase IV (Abb. 2.1 B).

Zunächst binden Ku70 und Ku80 als Ku-Komplex an die durch den DSB freien DNA-Enden (Abb. 2.1 B). Aufgrund ihrer hohen Affinität zu DNA und zueinander, halten die Ku-Proteine die DNA-Enden in räumlicher Nähe und verhindern ein Wegdriften der DNA-Stränge (Walker *et al.*, 2001). Dadurch wird das Risiko einer Ligation mit anderen freien DNA-Enden verringert. Im nächsten Schritt rekrutiert der Ku-Komplex DNA-PK<sub>cs</sub>, ein Protein der Familie Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K). Die weitere Prozessierung erfolgt mit der Nuklease Artemis, die fehlerhafte Stellen aus der DNA ausschneidet. XRCC4 rekrutiert schließlich die DNA-Ligase IV, die die beiden Bruchenden wieder miteinander verknüpft. Ku70 und Ku80, DNA-PK<sub>cs</sub> sowie DNA-Ligase IV und XRCC4 sind Schlüsselproteine des NHEJ (Lopez-Contreras und Fernandez-Capetillo, 2012).

Ein mutationsbedingter Funktionsverlust der DNA-PK<sub>cs</sub> führt bei Mäusen zu einer schweren kombinierten Immunschwäche (SCID, von engl. *severe combined immunodeficiency*). Tritt durch eine Mutation eine Fehlfunktion der an der NHEJ beteiligten DNA-PK<sub>cs</sub> auf, kann auch der DNA-Reparaturweg nicht mehr richtig reparieren. Dadurch sind Mäuse mit einem Defekt in der DNA-PK<sub>cs</sub> strahlensensitiver. Zur Untersuchung der Auswirkungen dieser Fehlfunktion wurden während dieser Arbeit sog. SCID-Mäuse, die für die autosomal-rezessive vererbte Mutation der DNA-PK<sub>cs</sub> homozygot sind, untersucht.



**Abb. 2.1: Mechanismen der DSB-Reparatur**

**A HR:** Der MRN-Komplex erkennt DSBs und aktiviert die ATM-Kinase, welche wiederum die DNA-Reparatur initiiert. Die Aktivität von CtIP ist für die Endresektion vom 5' zum 3'-Ende der DNA erforderlich, was zur Formation von ssDNA führt. Diese freiliegende ssDNA wird mit RPA umhüllt und aktiviert ATR um die HR zu erleichtern. RAD51 ersetzt dann RPA, sucht nach homologen DNA-Sequenzen und vermittelt die Stranginvasion. DSBs werden durch Ligation des neu synthetisierten Sequenzstücks mittels einer DNA-Ligase repariert. **B NHEJ:** An die freien DSB-Enden bindet direkt der Ku70/Ku80-Komplex, um die beiden Enden beieinander zu halten. Die weitere Prozessierung erfolgt über DNA-PKcs und Artemis. Die Ligation wird mittels des XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplexes realisiert (modifiziert nach Peng und Lin, 2011).

### 2.2.3 p53 bindendes Protein 1 (53BP1) als Marker für DSBs

53BP1 wurde auf der Suche nach Interaktionspartnern des Tumorsuppressorproteins p53 identifiziert (Iwabuchi *et al.*, 1994). Während der Reparatur von DSBs verändert sich die Chromatinstruktur, wodurch Histone freigelegt werden, an deren methylierten Lysinresten 53BP1 binden und akkumulieren kann (Huyen *et al.*, 2004). Nach Markierung mit spezifischen Antikörpern sind diese 53BP1-Akkumulationen, sog. Foci, unter dem Fluoreszenzmikroskop als kleine Punkte innerhalb des Zellkerns zu erkennen. Weiterhin konnte eine Co-Lokalisation von 53BP1 mit  $\gamma$ H2AX, der phosphorylierten Form des Histons H2AX, nachgewiesen werden (Adams und Carpenter, 2006). H2AX wird auf ionisierende Strahlung hin

direkt durch Phosphoinositid-3-Kinasen (PIK-Kinasen) phosphoryliert und lokalisiert an DNA-Schäden (Rogakou *et al.*, 1998, 1999). Diese Akkumulation kann, wie für 53BP1, durch spezifische Antikörper in der Immunfluoreszenz markiert und als  $\gamma$ H2AX-Foci visualisiert werden (Rogakou *et al.*, 1998, 1999). Eine Quantifizierung der 53BP1- und der  $\gamma$ H2AX-Foci kann also indirekt Aufschluss über das Ausmaß des DNA-Schadens geben (Bhogal *et al.*, 2009; Rube *et al.*, 2011; Schanz und Schuler *et al.*, 2012).

## 2.3 Der murine Hoden

Der Hoden, auch Testikel genannt, beschreibt die inneren männlichen Keimdrüsen und ist paarig angelegt. Neben der Produktion der Spermien, ist er für den Hormonhaushalt eines männlichen Organismus essentiell. Er ist ein aus mehreren Kompartimenten aufgebautes komplexes System.

### 2.3.1 Morphologie und Spermatogenese

Die murinen Keimdrüsen bestehen unter anderem aus dem Samenleiter, dem Nebenhoden und dem Hoden (Abb. 2.2). Im Hoden sind die sog. Samenkanälchen (auch *Tubuli seminiferi*) lokalisiert (Abb. 2.2 A), in denen die Spermatogenese stattfindet. Die Spermatogenese beschreibt die Reifung der spermatogonischen Stammzellen (SSCs, von engl. *spermatogonial stem cells*) bis hin zu einem fertigen Spermium. Im Querschnitt ist zu erkennen, dass die Tubuli von interstitiellem Gewebe, das aus Blutgefäßen und Leydig-Zellen besteht, umschlossen sind (Abb. 2.2 B). Die direkte Begrenzung der Tubuli bildet eine Basalmembran und daran angrenzend eine Schicht von peritubulären Myoidzellen (PTM). Von der Basalmembran ausgehend reihen sich die verschiedenen Zellreifungsstadien in Richtung des Lumens auf. Im Lumen sammeln sich schließlich die reifen Spermien bevor diese in den Nebenhoden transportiert werden. Für die Spermatogenese wichtige Hormone werden unter anderem von den im Tubulus liegenden somatischen Sertoli-Zellen sezerniert, die die Keimzellen umschließen. In der detaillierten schematischen Darstellung eines Tubulus sind neben den Sertoli-Zellen die einzelnen Keimzellstadien zu erkennen (Abb. 2.2 C).

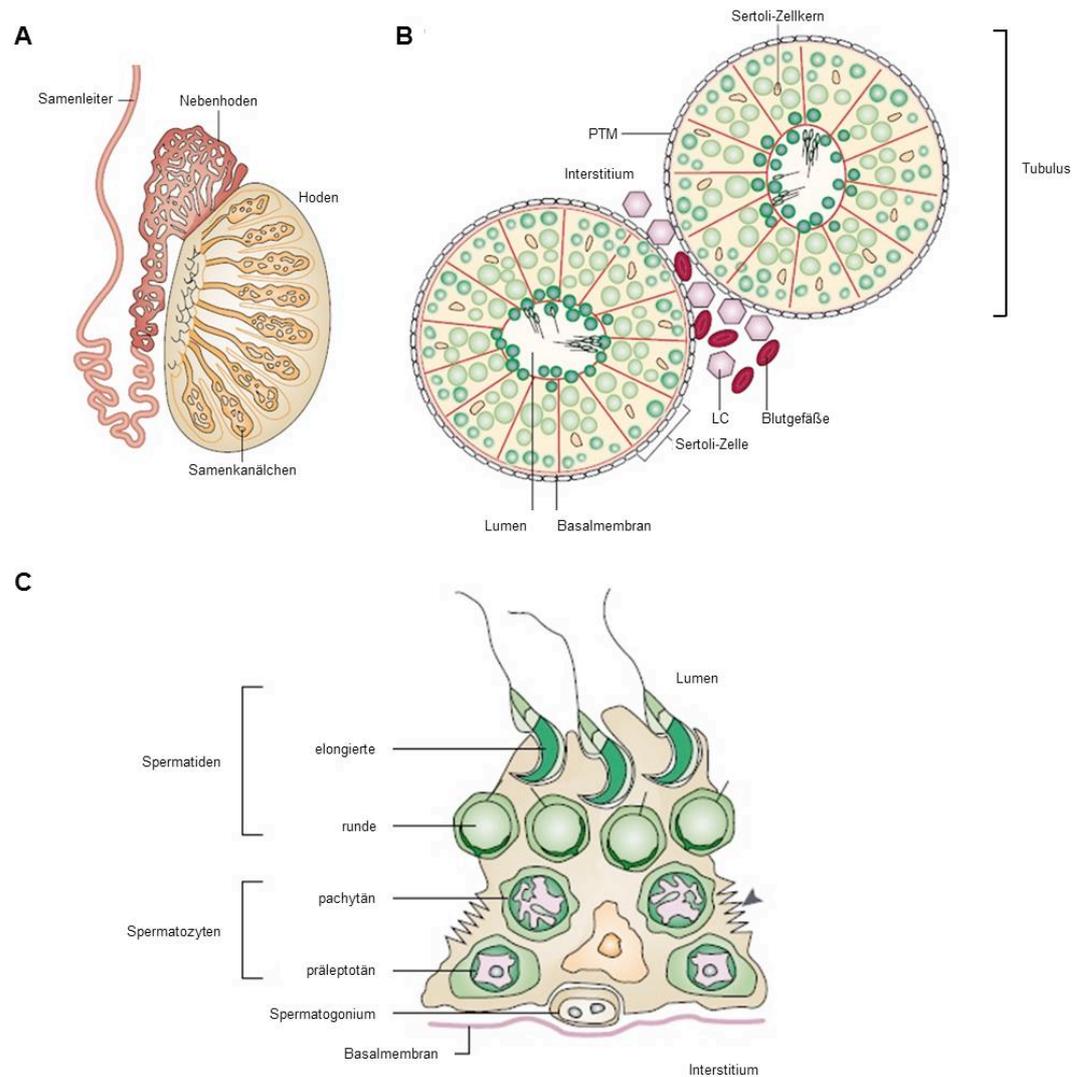
Die Spermatogonien, zu denen auch die SSCs gehören, liegen am basalen Rand des Tubulus. Als nächstes Reifestadium sind die Spermatozyten in verschiedenen meiotischen Phasen dargestellt. Darauf folgen die runden Spermatiden und schließlich die im Lumen liegenden elongierten Spermatiden. Der Bereich, in dem die prämeiotischen Zellstadien (Spermatogonien, frühe präleptotäne Spermatozyten) lokalisiert sind, das sog. Basalkompartiment, wird durch *tight junctions* (Abb. 2.2, Pfeilspitze) zwischen benachbarten Sertoli-Zellen von dem Bereich abgetrennt, in dem die (post-)meiotischen Zellen (Spermatozyten, Spermatiden) lokalisiert sind, dem sog. Adluminalkompartiment (Dym und Fawcett, 1970). Diese als Blut-Hoden-Schranke bekannte Barriere dient zum Schutz der differen-

zierenden Keimzellen vor Schadstoffen und Antikörpern aus dem Blut. Sie wird weiterhin von der umgebenden PTM-Schicht unterstützt.

Bei einer Maus nimmt die Spermatogenese, der sog. Epithelzyklus, einen Zeitraum von 35 Tagen in Anspruch (Oakberg, 1956). Eine SSC hat die Fähigkeit, wie Stammzellen anderer Gewebe, durch mitotische Teilungen sich selbst zu erneuern und Nachkommen zur weiteren Differenzierung zu bilden. Die Spermatogenese beginnt mit mitotischen Teilungen der SSC.

Aufgrund ihres Einzelvorkommens werden diese auch  $A_{\text{single}}$ -Spermatogonien genannt (Oakberg, 1971; de Rooij, 1973). Nach einer ersten Mitose verbleibt eine der beiden Tochterzellen als SSC im Stammzellpool, während die andere sich nochmals teilt. Bleibt eine interzelluläre Verbindung bestehen, spricht man von  $A_{\text{paired}}$ -Spermatogonien.

Durch weitere Zellteilungen können ganze Ketten von bis zu 16 Zellen entstehen, die dann als  $A_{\text{aligned}}$ -Spermatogonien bezeichnet werden (Oatley und Brinster, 2006). Auf diese undifferenzierten Stadien folgen die Stadien der Differenzierung, beginnend mit den  $A_1$ - $A_4$ -Spermatogonien. Die  $A_4$ -Spermatogonien differenzieren zu Intermediate-Spermatogonien, die sich schließlich zu den B-Spermatogonien entwickeln (Ehmcke *et al.*, 2006). Eine letzte mitotische Teilung bringt die primären Spermatozyten hervor, die sich über eine erste meiotische Phase zu sekundären Spermatozyten und nach einer zweiten meiotischen Phase zu runden Spermatiden weiterentwickeln. Die runden Spermatiden besitzen nur noch einen haploiden Chromosomensatz und differenzieren während der Spermiogenese zu elongierten Spermatiden.



**Abb. 2.2: Aufbau des murinen Hodengewebes**

**A** Querschnitt durch einen Hoden mit Samenleiter, Nebenhoden und Samenkanälchen. **B** Querschnitt durch zwei Samenkanälchen, den sog. Tubuli seminiferi. Die Keimzellen der verschiedenen Reifestadien (grün) sind in Sertoli-Zellen (gelb) eingebettet. Im Lumen sammeln sich die reifen Spermatozoen. Die Tubuli werden von der Basalmembran und einer Schicht aus peritubulären Myoidzellen (PTM) begrenzt. Im Interstitium finden sich Leydig-Zellen (LC, rosa) und Blutgefäße (rot). **C** Detaillierter Querschnitt durch eine Sertoli-Zelle mit ihren assoziierten Keimzellen. Die Sertoli-Zelle umschließt die meiotischen (Spermatozyten), wie auch die postmeiotischen Zellen (runde und elongierte Spermatozyten) vollständig. Die Anordnung der einzelnen Reifestadien erstreckt sich von der Basalmembran (Spermatogonien) bis hin zum Lumen (elongierte Spermatozyten). Das Zytoplasma ist in dunkelgrün, die DNA in rosa und der Sertoli-Zellkern in orange dargestellt (modifiziert nach Cooke und Saunders, 2002).

### 2.3.2 Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) als Marker für SSCs

Das humane PLZF-Gen, auch als Zfp145 oder Zbtb16 bekannt, wurde erstmals in einem an akuter promyeloischer Leukämie erkrankten Patienten beschrieben (Chen *et al.*, 1993). Im murinen Hoden ist PLZF für die Aufrechterhaltung des Stammzellpools und somit für die Spermatogenese essentiell. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der ausschließlich in undifferenzierten A-Spermatogonien ( $A_{\text{single}}$ ,  $A_{\text{paired}}$ ,  $A_{\text{aligned}}$ ) exprimiert wird (Costoya *et al.*, 2004; Buaas *et al.*, 2004; Payne und Braun, 2006), weshalb es sich als Markerprotein für SSCs eignet. Die Tatsache, dass PLZF die Transkription des c-Kit-Rezeptors inhibieren kann, sorgt für die Aufrechterhaltung des Stammzellpools (Filipponi *et al.*, 2007), da der c-Kit-Rezeptor, der durch das Stammzellfaktor-(SCF)-Protein (von engl. *stem cell factor*) aktiviert wird, für den Übergang von  $A_{\text{aligned}}$ - zu  $A_1$ -Spermatogonien essentiell ist (Schrans-Strassen *et al.*, 1999). Fehlt die inhibierende Wirkung von PLZF vollständig, entwickeln sich die  $A_{\text{aligned}}$ - zu  $A_1$ -Spermatogonien, differenzieren aus und verschieben so das im Gewebe herrschende Gleichgewicht in Richtung der Differenzierung, was langfristig zu einem Stammzellverlust und somit zu Infertilität führt.

Experimente, bei der eine vollständige Stilllegung des PLZF codierenden Gens untersucht wurde, zeigten einen verkleinerten Hoden in Folge des fortschreitenden Verlusts von Spermatogonien und eine erhöhte Apoptoserate, wobei die somatischen Sertoli-Zellen nicht betroffen waren (Costoya *et al.*, 2004). Untersuchungen des Luxoid-Mausmodells, in dem das codierende Gen durch eine nonsense-Mutation ausgeschaltet ist, zeigten einen ähnlichen Phänotypen (Buaas *et al.*, 2004). Durch Transplantation von SSCs aus Luxoid-Mäusen in gesunde Empfängermäuse konnte bestätigt werden, dass durch das Fehlen von PLZF die Fähigkeit der SSCs in Empfängergewebe zu kolonisieren verloren geht (Buaas *et al.*, 2004), was die Wichtigkeit dieses Proteins für die Spermatogenese unterstreicht.

### 2.3.3 DNA-Reparatur und Strahlenempfindlichkeit männlicher Keimzellen

DSBs stellen die größte Bedrohung der genetischen Integrität dar. Wie ein bestimmter Zelltyp einen DSB erkennt, hat Auswirkungen auf die Strahlensensitivi-

tät verschiedener Zelltypen (Olive, 1998). Aufgrund der potentiellen Vererbung an Nachkommen ist gerade in den Keimzelllinien eine intakte DNA-Reparatur essentiell. Zur Untersuchung der Auswirkungen von Strahlung auf einen Organismus sind Mäuse als Modelltiere sehr gut etabliert (Sugiura und Failla, 1922; Fogg und Cowing, 1951; Kochar und Harrison, 1971; Meistrich *et al.*, 1984; van der Meer *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1998; Haines *et al.*, 2002; Rube *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2013)

Die verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Tubulus (Abb. 2.2) können unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen einleiten. Für Spermatogonien konnte mittels Markerproteinen gezeigt werden, dass sowohl durch NHEJ als auch HR DNA-Schäden repariert werden (Ahmed *et al.*, 2007). In Spermatozyten hingegen findet während deren Meiose häufiger die HR statt. In den darauf folgenden runden Spermatiden ist die HR aufgrund fehlender homologer Schwesterchromatiden nicht möglich, weshalb in diesen Zellen die NHEJ der vorwiegende DNA-Reparaturmechanismus ist (Ahmed *et al.*, 2007).

Unabhängig der Strahlungsart gelten die sich schnell teilenden, differenzierenden Spermatogonien als die radiosensitivsten Zellen im murinen Hoden (Shaver *et al.*, 1953; Oakberg, 1955; Oakberg, 1959; van Beek *et al.*, 1984; Meistrich *et al.*, 1984). Die undifferenzierten Stammzellen hingegen sind weniger radiosensitiv (Meistrich, 1986). Mit fortlaufender Differenzierung der Spermatogonien zu Spermatozoen nimmt die Radiosensitivität ab, was neben der unterschiedlich effizienten DNA-Reparatur auch durch Chromatinkondensation und den Austausch von Histonen durch Protamine bedingt ist (Joshi *et al.*, 1990; van Loon *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 2007). Für die Differenzierung der runden zu den elongierten Spermatiden ist der Austausch von Histonen durch Protamine essentiell, da dadurch eine größere Kompaktion des Chromatins erreicht werden kann (Joshi *et al.*, 1990). Die gesteigerte Radioresistenz elongierter Spermatiden ist somit auch durch Protamine bedingt, da diese durch ihren hohen Cysteingehalt einen erhöhten Anteil an Thiolgruppen haben. Diesen Thiolgruppen wird in der Literatur eine Funktion als Radioprotektor zugeschrieben (Bump *et al.*, 1992; Joshi *et al.*, 1990).

Somatische Zellen wie Sertoli- oder Leydig-Zellen werden weniger bis kaum durch Strahlung beeinträchtigt (Fogg und Cowing, 1951; Oakberg und DiMinno, 1960; Erickson und Blend, 1976; Ahmed *et al.*, 2007).

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Vererbung eines intakten Genoms an nachkommende Generationen ist von entscheidender Bedeutung für den Erhalt einer Art. Um die Integrität des Genoms zu gewährleisten, existieren verschiedene Mechanismen zur Reparatur von DNA-Schäden, die durch endogene oder exogene Einflüsse verursacht wurden.

Innerhalb eines Organismus fällt dem Genom der SSCs eine besondere Stellung zu, da dieses potentiell an Nachkommen weitergegeben wird. Eine Untersuchung der Auswirkungen ionisierender Strahlung auf SSCs und die Spermatogenese ist folglich von besonderem Interesse. Über die Auswirkungen einer fortlaufenden Bestrahlung mit niedrigen Dosen auf murines Hodengewebe ist bisher wenig bekannt (Sheridan, 1971; van der Meer *et al.*, 1993; Rube *et al.*, 2011, Gong *et al.*, 2013; Belling *et al.*, 2013). Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Folgen einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf murines Hodengewebe. Es sollen die Fläche der Tubuli bestimmt werden und pro Tubulus jeweils die Anzahl der SSCs, proliferierender und apoptotischer Zellen sowie die Anzahl der 53BP1-Foci in SSCs analysiert werden.



### 3 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgeführt, sowie die angewandten Methoden erläutert.

#### 3.1 Chemikalien

Tabelle 3.1 fasst alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, unter Angabe der Bezugsfirma, in alphabetischer Reihenfolge zusammen.

Tab. 3.1: Liste der Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsfirma</b>
2-Propanol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Eindeckmedium, wässrig	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Eosin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, 100 %	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Deutschland
Formaldehyd, 37 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Immersionsöl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin, 10 %	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg Deutschland
Natriumchloridlösung, 0,9 %	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2–7,4	Apotheke der Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland
Rompun, 2 %	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Wasser, destilliert	Apotheke der Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Ziegenserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Zitratpuffer, pH 6,0	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

## 3.2 Verwendete Antikörper

Die spezifische Markierung der im Gewebe zu untersuchenden Proteine erfolgte mittels der in Tabelle 3.2 aufgelisteten Primärantikörper. Zur Visualisierung der markierten Proteine, wurden Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper (Tab. 3.3) appliziert, die spezifisch an die entsprechenden Primärantikörper binden. Die Antikörper wurden in einer 1 %-igen Ziegenserumlösung (in PBS) gelöst und in den in Tabelle 3.2 und 3.3 aufgelisteten Endverdünnungen eingesetzt. Die Anfangskonzentrationen der jeweiligen Antikörper sind den Datenblättern der Herstellerfirmen zu entnehmen. Die experimentelle Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung wird im methodischen Abschnitt beschrieben.

### 3.2.1 Primärantikörper

Tab. 3.2: Liste der verwendeten Primärantikörper (unter Angabe der Bestellnummer, des Herstellers sowie der angewandten Verdünnung während der Immunfluoreszenzfärbung)

Antikörper	Bestellnummer	Hersteller	Endverdünnung
mouse-anti-PLZF	OP128L	Calbiochem / Merck, Nottingham, United Kingdom	1:50
rabbit-anti-53BP1	IHC-00001	Bethyl Laboratories Inc., Hamburg, Deutschland	1:200
rabbit-anti-PARP1 (cleaved E51)	ab32064	Abcam plc, Cambridge, United Kingdom	1:100
rat-anti-Ki67	M7249	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland	1:50

### 3.2.2 Sekundärantikörper

Tab. 3.3: Liste der verwendeten Sekundärantikörper (unter Angabe der Bestellnummer, des Herstellers sowie der angewandten Verdünnung der Immunfluoreszenzfärbung)

Antikörper	Bestellnummer	Hersteller	Endverdünnung
Alexa Fluor® 568 goat-anti-mouse IgG <sub>2a</sub>	857224	Life Technologies GmbH / Invitrogen, Frankfurt, Deutschland	1:400
Alexa Fluor® 488 goat-anti-rabbit IgG	A-11008		1:400
Alexa Fluor® 488 goat-anti-rat IgG	A11006		1:400

### 3.3 Versuchstiere

Es wurden sowohl reparaturprofiziente C57BL/6N-Mäuse (C57-Mäuse), als auch reparaturdefiziente CB17-*Prkdc*<sup>scid</sup>-Mäuse (SCID-Mäuse) untersucht. Die während dieser Arbeit untersuchten SCID-Mäuse weisen eine natürliche autosomal-rezessive Mutation der DNA-PK<sub>cs</sub> auf, einem Schlüsselprotein der NHEJ. Die verwendeten Mäuse sind für diese Mutation homozygot (Charles River, 2004). Sie kennzeichnen sich durch eine erhöhte Strahlensensitivität aufgrund der durch die Mutation beeinträchtigten NHEJ aus.

Beide Mausstämme wurden von der Firma Charles River Laboratories International, Inc. (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Bis zur Gewebepreparation wurden die Mäuse im Versuchstierstall des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach dem Tierschutzgesetz und den Bestimmungen des Veterinäramtes des Saarlandes versorgt. Bei einem Tages-Nacht-Rhythmus von 12 h:12 h wurden die Tiere mit Wasser und Futter *ad libitum* versorgt.

### 3.4 Fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Niedrigdosisbestrahlung auf murines Hodengewebe wurden sechs Wochen alte Tiere des C57- wie auch des SCID-Stammes montags bis freitags mit 10 bzw. 100 mGy (eine Bestrahlung pro Tag entspricht einer Fraktion) in einem Linearbeschleuniger (Artist, Siemens AG, Healthcare Sector, Erlangen, Deutschland) mit einer Elektronenenergie von 6 MeV, und einer Dosisleistung von 2 Gy/min bestrahlt.

Die C57-Mäuse wurden über maximal 10 Wochen (50 x), die reparaturdefizienten SCID-Mäuse wurden wegen ihrer erhöhten Strahlensensitivität über maximal vier Wochen (20 x) in einem speziellen Plexiglaszylinder bestrahlt. Um eine gleichmäßige Dosisverteilung zu gewährleisten wurde die Ganzkörperbestrahlung mit dem dreidimensionalen Planungssystem ADAC Pinnacle so berechnet, dass die 95 %-Isodose den gesamten Tierkörper abdeckte. Die Präparation der Gewebe erfolgte 24 bzw. 72 h nach der letzten Bestrahlungsfraction, bei der Einmalbestrahlung (=Induktion) zusätzlich auch 0,5 h nach Bestrahlung. Zusätzlich wurden mit 50 x 100 mGy bestrahlte C57-Mäuse 35 bzw. 70 Tage (Regeneration) nach der letzten Bestrahlung präpariert und untersucht (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Bestrahlungsplan zur fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung adulter Mäuse

Niedrigdosisbestrahlung mit 10 bzw. 100 mGy												
Fraktionen	1 x		10 x		20 x		30 x		40 x		50 x	
Zeitpunkte [h]	0,5	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	Regeneration 35 d, 70 d

### 3.5 Gewebepräparation

Die Tiere wurden 0,5, 24 bzw. 72 h nach der letzten Bestrahlung unter Ketamin–Rompun–Narkose (intraperitoneale Injektion von 120 µg Ketamin und 16 µg Rompun pro Kilogramm Körpergewicht gelöst in 0,9 %–iger Natriumchloridlösung) durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurden durch die eröffnete Bauchhöhle die Hoden entnommen und über Nacht (mindestens 16 Stunden) in einer 4 %–igen Formalinlösung (140 ml Formaldehyd, 37 %; 11,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) fixiert. Nach automatischer Dehydrierung in einem Einbettautomaten (Shandon Excelsior ES, Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Hoden in Paraffin (Tissue Tek TEC, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) eingeblockt, mittels Mikrotom (Leica RM2235, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) in 4 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträgern in einem auf 50 °C erwärmten Wasserbad geglättet.

Nach vollständigem Trocknen konnten die so vorbereiteten Testikelschnitte weiterverarbeitet und nach Hämatoxylin–Eosin– oder Immunfluoreszenzfärbung unter einem Mikroskop (Nikon Eclipse E600, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) untersucht werden.

### 3.6 Färbungen

Während dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Färbeprotokolle angewandt, die in den folgenden Unterkapiteln kurz erläutert werden.

#### 3.6.1 Hämatoxylin–Eosin–Färbung

Die Hämatoxylin–Eosin–Färbung (HE–Färbung) diente als Übersichtsfärbung, wobei das Hämatoxylin die Zellkerne und das Eosin das Zytoplasma anfärbt. Zunächst wurden die Gewebe durch Eintauchen in ein Xylolbad (3 x 7 min) deparaf-

finisiert. Die Rehydrierung der Gewebe erfolgte durch Inkubation zu je 3 min in einer absteigenden Alkoholreihe (99 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %). Im Anschluss daran wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser geschwenkt, 1 min in einer 5 %-igen Hämatoxylin-Lösung inkubiert und dann 10 bis 15 min unter fließendem Wasser gewässert. Nach einer Inkubationsdauer von 15 min in einer 0,1 %-igen Eosin-Lösung, wurden die Objektträger bis keine Farbschwaden mehr zu sehen waren in 70 % Alkohol geschwenkt und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 99 %, jeweils 10–15 s) dehydriert. Abschließend wurden die Schnitte 3 x 30 s in Xylol getaucht. Nach Verdunsten des Xylols wurden die Schnitte mit einem wässrigen Eindeckmedium benetzt und schließlich mit einem Deckglas abgedeckt. Nach Trocknung des Eindeckmediums konnten die Gewebe mittels Durchlichtmikroskop untersucht werden.

### **3.6.2 Immunfluoreszenzfärbung**

Wie bei der HE-Färbung wurden die auf den Objektträgern befindlichen Gewebe in einem Xylolbad deparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Wiederherstellung der Antigene wurden die Präparate im Anschluss 1 h in Zitratpuffer (pH 6) bei 95 °C im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen und kurzem Waschen in destilliertem Wasser wurden unspezifische Bindungsstellen 1 h bei Raumtemperatur (RT) mit einer 1 %igen Ziegenserumlösung geblockt. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht, mindestens 12 h. Nach dreimaligem Waschen in PBS zu je 5 min folgte eine einstündige Inkubation des entsprechenden Sekundärantikörpers bei RT. Im Fall einer Doppelfärbung wurden sowohl beide Primärantikörper als auch die entsprechenden Sekundärantikörper in einem Mix wie beschrieben inkubiert. Die jeweils eingesetzten Antikörper sowie deren Endverdünnungen sind in Kapitel 3.2 zusammengefasst.

Schließlich wurden die Schnitte nach Einzel- oder Doppelfärbung 3 x 5 min in PBS gewaschen, mit DAPI enthaltendem Eindeckmedium benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach Trocknung des Eindeckmediums konnten die Gewebe unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

### 3.7 Mikroskopie

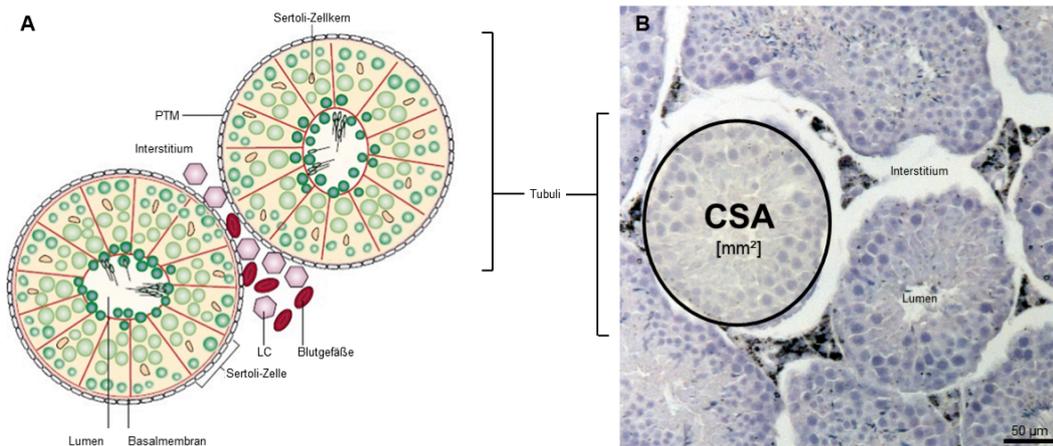
Sowohl die mittels HE- als auch die mit mittels Immunfluoreszenzfärbung gefärbten Gewebepreparate wurden unter einem Nikon Eclipse E600-Mikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) untersucht. Bei dem Mikroskop handelt es sich um eine Kombination aus Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop mit integrierter Kamera (Software NIS Elements BR 3.0; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland), die Aufnahmen beider Färbemethoden ermöglicht.

Das Mikroskop ist mit drei verschiedenen Filtern mit unterschiedlicher Wellenlängendurchlässigkeit (DAPI Ex. 340–380, Em. 435–483, FITC Ex. 465–495, Em. 515–555, Texas Red Ex. 540–580, Em. 600–660) ausgestattet, wodurch die Fluorochrome der in Tabelle 3.3 aufgeführten markierten Sekundärantikörper getrennt untersucht werden können.

#### 3.7.1 Bestimmung der Querschnittsfläche von Tubuli im Hodengewebe

Der Aufbau eines Hodens ist ausführlich in Kapitel 2.3 beschrieben. In Abb. 3.1 ist eine schematische Darstellung eines Querschnitts durch zwei Tubuli (Abb. 3.1 A) einer HE-gefärbten murinen Hodengewebeprobe (Abb. 3.1 B) gegenübergestellt. Die durch die schwarze Umrandung abgegrenzte Fläche beschreibt die Tubulusquerschnittsfläche (CSA, engl. *cross sectional area*).

Die Messung der CSA erfolgte mit Hilfe der Software NIS Elements BR 3.0 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland), die nach Abgrenzen der Querschnittsfläche automatisch den minimalen wie auch den maximalen Feret-Durchmesser anzeigte. Der Feret-Durchmesser ist der Abstand zweier Tangenten links und rechts eines Objektes, hier eines Tubulus. Es wurden nur solche Tubuli berücksichtigt, deren Quotient aus minimalem und maximalem Feret-Durchmesser  $\geq 0,5$  war (Bördlein *et al.*, 2011; persönliche Kommunikation). Die durch die Umrandung aufgespannte Fläche wurde in  $\text{mm}^2$  angegeben.



**Abb. 3.1: Darstellung der Tubulusquerschnittsfläche**

**A** Schematische Darstellung eines Querschnitts durch zwei Tubuli. Grün: Keimzellen in verschiedenen Reifestadien. Gelb: Sertoli-Zellen. Rosa: Leydig-Zellen (LC). Rot: Blutgefäße. (modifiziert nach Cooke und Saunders, 2002) **B** Querschnitt durch eine mittels HE-Färbung angefarbte Hodengewebeprobe. Die schwarz umrandete Fläche grenzt die gemessene CSA ab. PTM = peritubulären Myoidzellen; CSA = *cross sectional area*, engl. für Querschnittsfläche.

Für den C57-Stamm wurde die CSA von je drei Mäusen 24 h, 35 und 70 Tage nach 10-, 30- und 50-facher Bestrahlung mit 10 bzw. 100 mGy bestimmt. Für die Bestimmung der CSA des SCID-Stammes standen zwei Mäuse zur Verfügung, die 24 h nach 10- und 20-facher Bestrahlung mit 10 bzw. 100 mGy untersucht wurden. Um hier die Untersuchungsgruppe zu vergrößern, wurden von den Gewebeproben der SCID-Mäuse zusätzlich technische Replikate angefertigt. Insgesamt wurden pro Replikat 100 Tubuli vermessen.

### 3.7.2 Quantifizierung der SSCs, der Proliferation und der Apoptose anhand von Markerproteinen

Zur Quantifizierung der Anzahl der SSCs, der Proliferation, wie auch der Apoptose, wurden Doppelfärbungen mit dem SSC-Marker PLZF jeweils mit einem Antikörper gegen ein Markerprotein für Proliferation (anti-Ki67) bzw. mit einem Apoptosemarker (anti-PARP1, *cleaved* E51) angefertigt.

Die Auswertung am Mikroskop war für alle Doppelfärbungen gleich: zunächst wurde bei 100-facher Vergrößerung das Feret-Verhältnis (Bedingung: Min/Max  $\geq 0,5$ ) eines Tubulus durch den DAPI-Filter bestimmt. Die Quantifizierung der PLZF-positiven Zellen, sowie die der jeweiligen Markerproteine (Ki67, PARP1), erfolgte bei 600-facher Vergrößerung durch den Texas Red- bzw. den FITC-

Filter. Es wurden je drei C57-Mäuse 24 h nach 10, 30 und 50 x 10 bzw. 100 mGy und zwei SCID-Mäuse 24 h nach 10 und 20 x 10 bzw. 100 mGy untersucht. Um die Untersuchungsgruppe des SCID-Stammes zu vergrößern, wurden von den Gewebeproben der SCID-Mäuse technische Replikate angefertigt. Zur Untersuchung der Anzahl PLZF-positiver SSCs und proliferierender Zellen nach festgesetzten Regenerationszeitpunkten wurden zusätzlich je drei C57-Mäuse 35 und 70 Tage nach 50 x 100 mGy analysiert. Je untersuchtem Tier wurden 50 Tubuli vermessen und ausgezählt.

### **3.7.3 Quantifizierung der 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs**

Um eine quantitative Aussage über die Anzahl der in PLZF-positiven SSCs auftretenden 53BP1-Foci treffen zu können, wurden diese im Mikroskop bei 600-facher Vergrößerung des Präparats gezählt. Die Identifizierung der PLZF-positiven Zellen erfolgte durch den Texas Red-Filter, die 53BP1-Foci wurden durch den FITC-Filter quantifiziert. Für die Quantifizierung der 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs wurden je drei C57-Mäuse 0,5, 24 und 72 h nach 10, 20, 30, 40 und 50 x 10 bzw. 100 mGy und zwei SCID-Mäuse 0,5, 24 und 72 h nach 10 und 20 x 10 bzw. 100 mGy untersucht. Um die Untersuchungsgruppe des SCID-Stammes zu vergrößern, wurden von den Gewebeproben der SCID-Mäuse zusätzlich technische Replikate angefertigt. Zur Untersuchung der verbleibenden 53BP1-Foci wurden zusätzlich je drei C57-Mäuse 35 und 70 Tage nach 50 x 100 mGy analysiert. Für jede untersuchte Maus wurden mindestens 40 Zellen und Foci gezählt.

## **3.8 Statistische Auswertung**

Aus den erhobenen Daten wurden jeweils die Mittelwerte und die entsprechenden Standardfehler berechnet. Um eine Aussage über die statistische Signifikanz der erhobenen Daten treffen zu können, wurde ein einseitiger Mann-Whitney-Test in Origin (Version 8.6G, OriginLab Corporation, Northampton/Massachusetts, USA), ausgeführt. Es wurden Wahrscheinlichkeitsmaße von  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*), und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) festgelegt.

## 4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen bzgl. der Auswirkungen einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf murines Hodengewebe zusammengefasst.

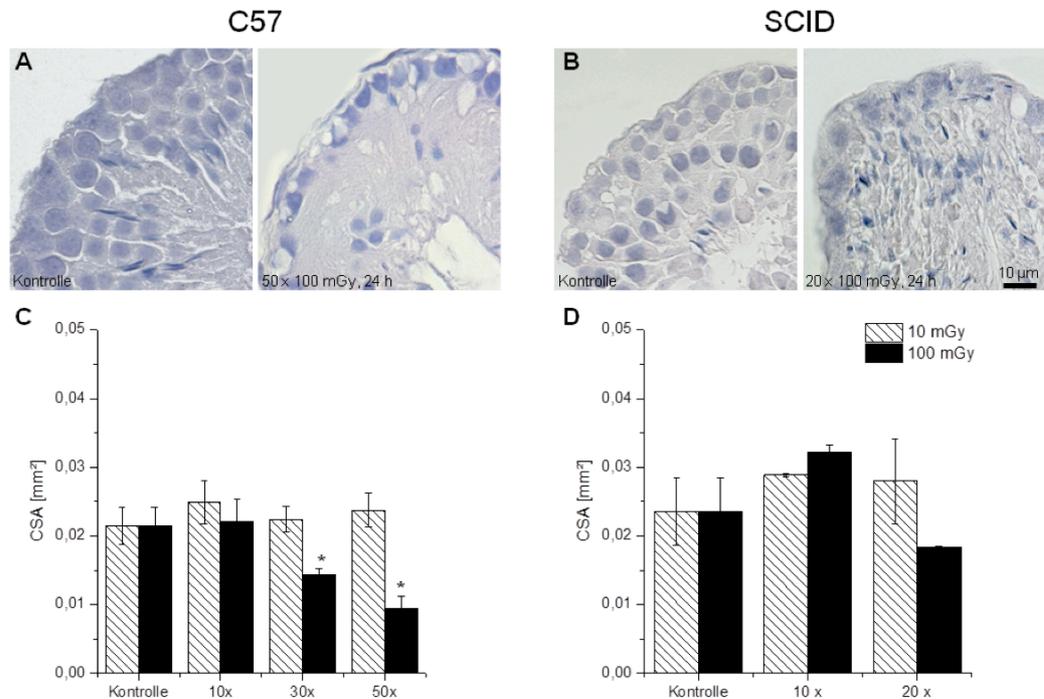
### 4.1 Bestimmung der Tubulusquerschnittsfläche

Die CSA von Gewebeproben von C57- und strahlensensitiveren SCID-Mäusen wurde gemessen, um die Auswirkungen der in Kapitel 3.4 beschriebenen fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf die Größe von murinen Tubuli zu untersuchen. Die C57-Mäuse wurden nach 10, 30 und 50 Fraktionen, die SCID-Mäuse nach 10 und 20 Fraktionen à 10 bzw. 100 mGy jeweils 24 h nach der letzten Bestrahlung untersucht (Abb. 4.1). Unbestrahlte Kontrolltiere wurden für beide Mausstämme als Referenz hinzugezogen. Für die Untersuchung wurden nur solche Tubuli berücksichtigt, deren Quotient aus minimalem und maximalem Feret-Durchmesser  $\geq 0,5$  war. Die histologischen Aufnahmen zeigen Ausschnitte von Querschnitten durch HE-gefärbtes Hodengewebe von C57- und SCID-Mäusen, wobei jeweils eine Kontroll- und ein bestrahltes Präparat dargestellt sind (Abb. 4.1 A, B). Je Replik wurden 100 Tubuli vermessen.

Im Hodengewebe von C57-Mäusen war 24 h nach 50 x 100 mGy eine verringerte Zellzahl innerhalb eines Tubulusquerschnitts zu erkennen (Abb. 4.1 A). Gewebeproben von SCID-Mäusen zeigten nach einer Bestrahlungsdosis von 20 x 100 mGy eine veränderte Zellanordnung im Tubulus (Abb. 4.1 B). Der bei C57-Mäusen beobachtete Zellverlust (Abb. 4.1 A) ist eine mögliche Ursache der Verkleinerung der CSA, weshalb das Messen der CSA als indirektes Maß für die Zellanzahl im Tubulus herangezogen werden kann.

Nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung der C57-Mäuse mit 10 mGy waren keine signifikanten Unterschiede zur unbestrahlten Kontrolle festzustellen (Abb. 4.1 C). Eine Bestrahlungsdosis von 100 mGy hatte nach 10 Fraktionen im Vergleich zur Kontrolle zunächst keine Veränderung der CSA zur Folge. Signifikante Verkleinerungen der CSA um 33 bzw. 56 % waren 24 h nach 30 bzw. 50 x 100 mGy festzustellen ( $p \leq 0,05$ ).

Ein Vergleich der CSA zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten SCID-Mäusen brachte sowohl bei einer täglichen Dosis von 10 als auch 100 mGy keine signifikanten Unterschiede hervor (Abb. 4.1 D).



**Abb. 4.1: Bestimmung der CSA**

**A, B:** Querschnitt durch einen Tubulus (Ausschnitt), HE-Übersichtsfärbung. Kontrolle und 24 h nach Bestrahlung mit 50 bzw. 20 x 100 mGy (**A:** C57; **B:** SCID). **C, D:** Dargestellt sind die CSA [mm<sup>2</sup>] einer Kontrolle, wie auch nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit 10 (weiß, diagonal gestreift) bzw. 100 mGy (schwarz) nach 10, 30 und 50 Fraktionen für den C57-Stamm (**C**) und nach 10 und 20 Fraktionen für den SCID-Stamm (**D**). Die CSA ist auf der *y*-Achse, die untersuchten Bestrahlungsfractionen sind auf der *x*-Achse aufgetragen. Die Gewebe wurden jeweils 24 h nach der letzten Bestrahlung fixiert. Signifikanz nach Mann-Whitney (jeweils in Bezug zur Kontrolle): \*  $p \leq 0,05$ . Die Fehlerbalken geben die berechneten Standardfehler an. CSA = *cross sectional area*, engl. für Querschnittsfläche.

## 4.2 Untersuchung der SSCs, der Proliferation und der Apoptose anhand von Markerproteinen

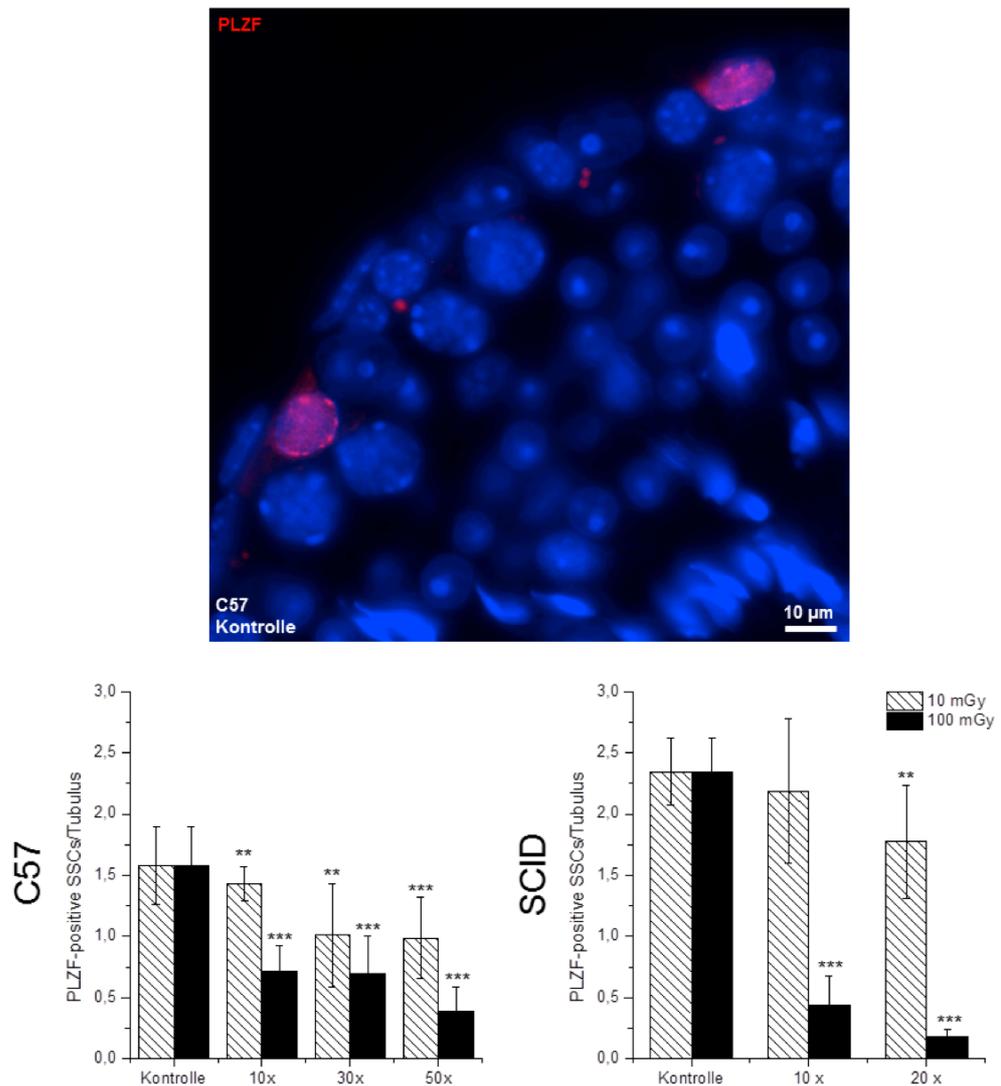
In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkungen der Bestrahlung auf die Anzahl der PLZF-positiven SSCs, der Ki67-positiven Zellen und der PARP1-positiven Zellen zusammengefasst. Die Quantifizierung Ki67-positiver Zellen diente der indirekten Untersuchung der Proliferation, mittels PARP1 sollte die Apoptose indirekt charakterisiert werden. Pro Replikat wurde die Anzahl der für die untersuchten Proteine positiven Zellen in 50 Tubuli ausgezählt.

### 4.2.1 Identifizierung und Quantifizierung der SSCs anhand des PLZF-Markerproteins

SSCs, die durch mitotische Teilungen die für eine erfolgreiche Spermatogenese essentiellen Tochterzellen hervorbringen, gehören zu den strahlensensitivsten Zellen im Hodengewebe. Die Quantifizierung der SSCs im Hodengewebe ist in Verbindung mit dem sichtbaren Zellverlust, einhergehend mit einer signifikanten Verkleinerung der CSA bei C57-Mäusen nach 30 und 50 x 100 mGy (Abb. 4.1) von besonderem Interesse. PLZF ist ein in der Literatur anerkannter Marker für SSCs (Aponte *et al.*, 2005) und wurde für die hier durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen zur Identifizierung der SSCs verwendet. PLZF-positive Zellen konnten nach entsprechender Immunfluoreszenzfärbung unter einem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. In Abbildung 4.2 ist ein Ausschnitt eines Tubulusquerschnitts einer unbestrahlten C57-Maus zu sehen, wobei die Zellkerne mittels DAPI in blau und die PLZF-positiven SSCs in rot dargestellt sind.

Eine fraktionierte Bestrahlung verursacht bereits nach einer Bestrahlungsdosis von 10 x 10 mGy eine um 27 % geringere Anzahl der SSCs im Gewebe (Abb. 4.2). Nach 30 bzw. 50 x 10 mGy nimmt die Anzahl um 42 bzw. 44 % ab. Eine Bestrahlung mit 10 x 100 mGy hat eine Verringerung der Anzahl PLZF-positiver Zellen um 59 % zur Folge. Nach 30 x 100 mGy nimmt die Anzahl um 60 % und nach 50 x 100 mGy um 78 % ab. Die Abnahme in Bezug zur Kontrolle ist bei C57-Mäusen für alle Fraktionen signifikant ( $p \leq 0,01$  für 10 und 30,  $p \leq 0,001$  für 50 Fraktionen).

Die Anzahl der SSCs pro Tubulus von SCID-Mäusen wurde ebenfalls bestimmt (Abb. 4.2, unten). Nach 10 x 10 mGy ist eine um 7 %, nach 20 x 10 mGy eine um 24 % verringerte Anzahl PLZF-positiver SSCs zu beobachten ( $p \leq 0,01$ ). Eine Bestrahlung mit 10 x 100 mGy verursacht eine um 81 %, eine mit 20 x 100 mGy eine um 92 % verringerte Anzahl PLZF-positiver SSCs pro Tubulus ( $p \leq 0,001$ ).



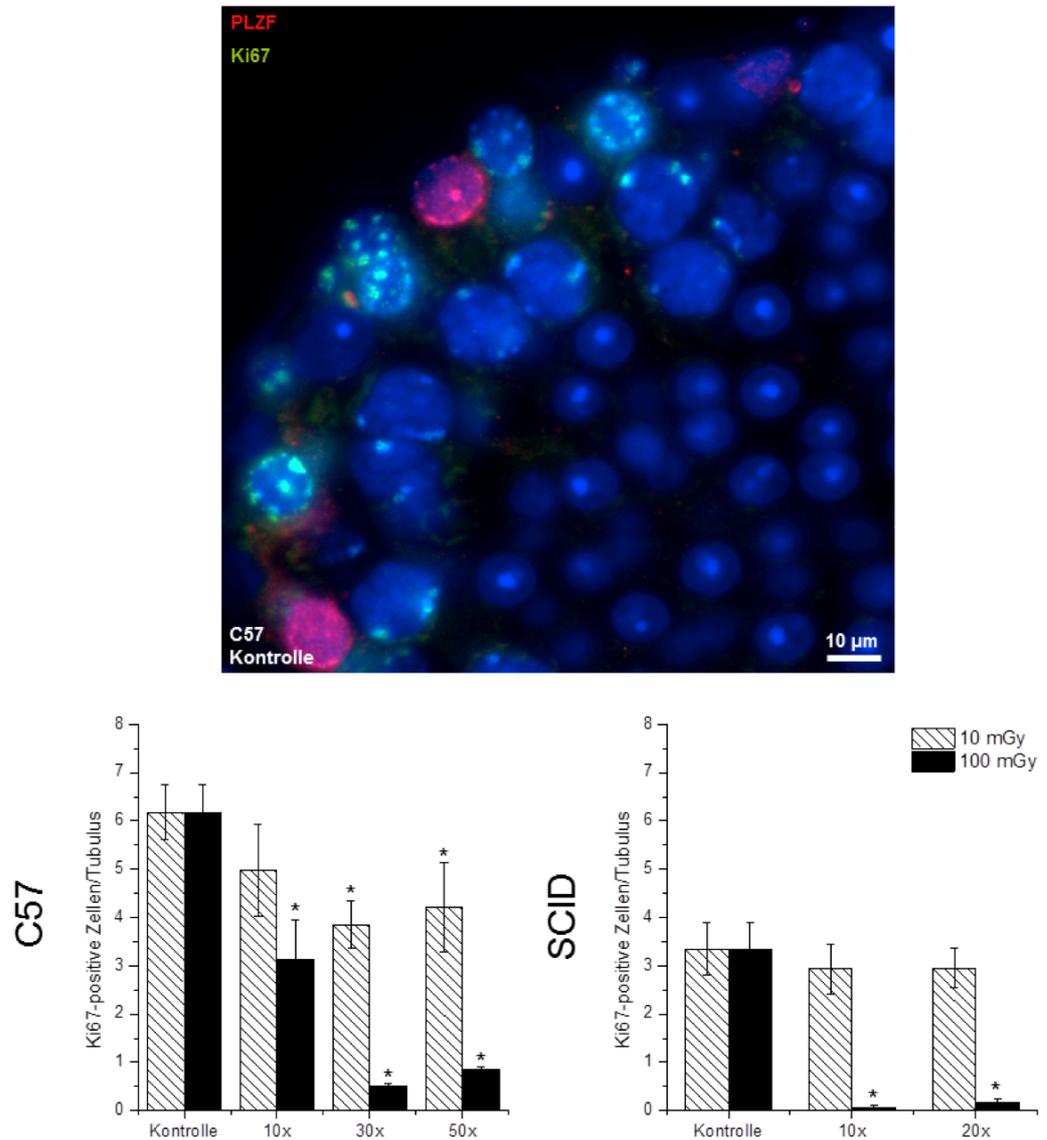
**Abb. 4.2: Anzahl PLZF-positiver SSCs pro Tubulus**

**Oben:** Immunfluoreszenzfärbung eines Tubulus einer C57-Kontrollmaus (Ausschnitt). Blau: Zellkerne, Rot: PLZF-positiver SSCs. **Unten:** Die Anzahl der PLZF-positiven SSCs pro Tubulus ist auf der y-Achse aufgetragen, die x-Achse gibt die jeweils untersuchten Bestrahlungsfractionen an. Die Bestrahlungsdosis betrug 10 (weiß, diagonal gestreift) bzw. 100 mGy (schwarz). Die untersuchten Gewebe wurden jeweils 24 h nach der letzten Bestrahlung fixiert. *Links:* C57-Stamm. *Rechts:* SCID-Stamm. Signifikanz nach Mann-Whitney (jeweils in Bezug zur Kontrolle): \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

## 4.2.2 Untersuchung der Proliferation anhand des Ki67-Markerproteins

Die Proliferation wurde indirekt mittels des Proliferationsmarkers Ki67 (Gerdes *et al.*, 1984) in Tubuli des Hodengewebes untersucht (Abb. 4.3), nachdem eine Verkleinerung der CSA und eine verringerte Anzahl PLZF-positiver SSCs nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung zu beobachten war. Hierzu wurden Ki67-positivere Zellen im Tubulusquerschnitt quantifiziert. In Abbildung 4.3 sind die Ergebnisse für den C57- und den SCID-Stamm zusammengefasst. Der Bildausschnitt zeigt eine Doppelfärbung gegen PLZF (rot) und Ki67 (grün), die Zellkerne sind mittels DAPI in blau angefärbt. Nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit 10 x 10 mGy ist bei C57-Mäusen eine um 19 % verringerte Anzahl Ki67-positiver Zellen im Gewebe im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle festzustellen. Nach 30 bzw. 50 x 10 mGy verringert sich die Anzahl um 38 bzw. 32 % ( $p \leq 0,05$ ). Bei einer Bestrahlungsdosis von 10 x 100 mGy waren 49 % weniger Ki67-positivere Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Nach 30 bzw. 50 x 100 mGy sank die Anzahl der Ki67-positiven Zellen um 92 bzw. 86 % ( $p \leq 0,05$ ; Abb. 4.3).

Die Quantifizierung Ki67-positiver Zellen in Gewebeschnitten von SCID-Mäusen ergab nach 10 bzw. 20 x 10 mGy eine um 7 bzw. 24 % verringerte Anzahl Ki67-positiver Zellen. Bestrahlungsdosen von 10 bzw. 20 x 100 mGy verursachten einen Verlust Ki67-positiver Zellen um 98 % bzw. 95 % ( $p \leq 0,05$ ; Abb. 4.3).



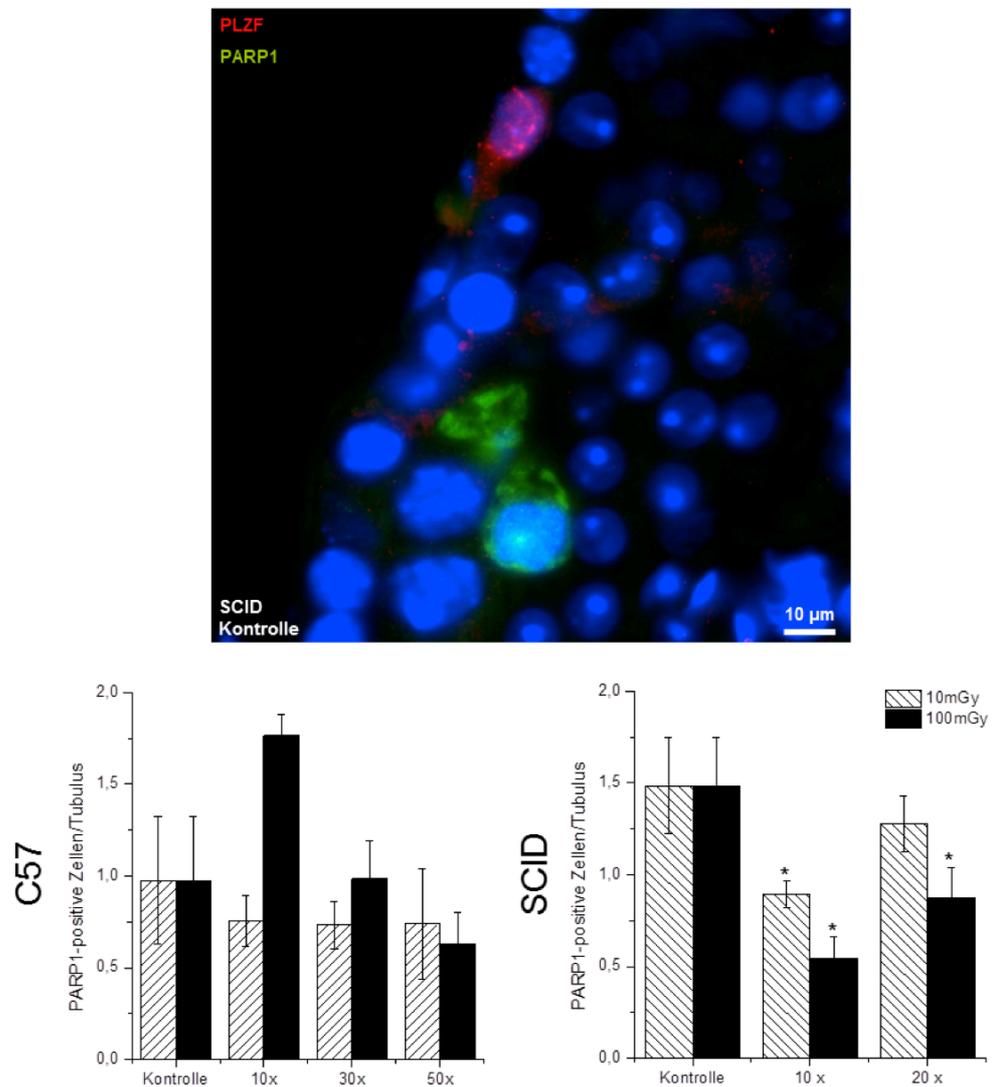
**Abb. 4.3: Anzahl Ki67-positiver Zellen pro Tubulus**

**Oben:** PLZF/Ki67-Doppelfärbung eines Tubulus einer C57-Kontrollmaus (Ausschnitt). Blau: Zellkerne, Rot: PLZF-positive SSCs, Grün: Ki67 zur Markierung proliferierender Zellen. **Unten:** Die Anzahl der Ki67-positiven Zellen pro Tubulus ist auf der y-Achse aufgetragen, die x-Achse gibt die jeweils untersuchten Bestrahlungsfractionen an. Die Bestrahlungsdosis betrug 10 (weiß, diagonal gestreift) bzw. 100 mGy (schwarz). Die untersuchten Gewebe wurden jeweils 24 h nach der letzten Bestrahlung fixiert. *Links:* C57-Stamm. *Rechts:* SCID-Stamm. Signifikanz nach Mann-Whitney (jeweils in Bezug zur Kontrolle): \*  $p \leq 0,05$ . Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

### 4.2.3 Untersuchung der Apoptose anhand des PARP1-Markerproteins

Bisher konnte beobachtet werden, dass eine fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung eine Verkleinerung der CSA (Abb. 4.1), sowie eine verringerte Anzahl PLZF- (Abb. 4.2) und Ki67-positiver (Abb. 4.3) Zellen zur Folge hat. Ein weiterer Aspekt, den es zu berücksichtigen gilt, ist die Apoptose. PARP1 ist ein an der Apoptose beteiligtes Protein. Während dieser Arbeit wurden PARP1-positive Zellen in bestrahltem und unbestrahltem Hodengewebe quantifiziert (Abb. 4.4). In Abbildung 4.4 sind die Ergebnisse für den C57- und den SCID-Stamm zusammengefasst. Der Bildausschnitt zeigt eine Doppelfärbung gegen PLZF (rot) und PARP1 (grün), die Zellkerne sind mittels DAPI in blau angefärbt.

Die Veränderungen der Anzahl PARP1-positiver Zellen pro Tubulus sind für den C57-Stamm zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant. Bei den untersuchten SCID-Mäusen verringert sich die Anzahl PARP1-positiver Zellen pro Tubulus nach 10 x 10 mGy um 40 % ( $p \leq 0,05$ ), nach 20 x 10 mGy ist der Unterschied zur Kontrolle nicht signifikant. Nach einer Bestrahlung von 10 x 100 mGy war eine um 63 % geringere Anzahl PARP1-positiver Zellen zu beobachten, nach 20 x 100 mGy ist die Anzahl der PARP1-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 41 % verringert ( $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 4.4: Anzahl PARP1-positiver Zellen pro Tubulus**

**Oben:** PLZF/PARP1-Doppelfärbung eines Tubulus einer SCID-Kontrollmaus (Ausschnitt). Blau: Zellkerne, Rot: PLZF-positive SSCs, Grün: PARP1 zur Markierung apoptotischer Zellen. **Unten:** Die Anzahl der PARP1-positiven Zellen pro Tubulus ist auf der y-Achse aufgetragen, die x-Achse gibt die jeweils untersuchten Bestrahlungsfractionen an. Die Bestrahlungsdosis betrug 10 (weiß, diagonal gestreift) bzw. 100 (schwarz) mGy. Die untersuchten Gewebe wurden jeweils 24 h nach der letzten Bestrahlung fixiert. Links: C57-Stamm. Rechts: SCID-Stamm. Signifikanz nach Mann-Whitney (jeweils in Bezug zur Kontrolle): \*  $p \leq 0,05$ . Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

### 4.3 Untersuchung der DNA-Reparatur mittels 53BP1

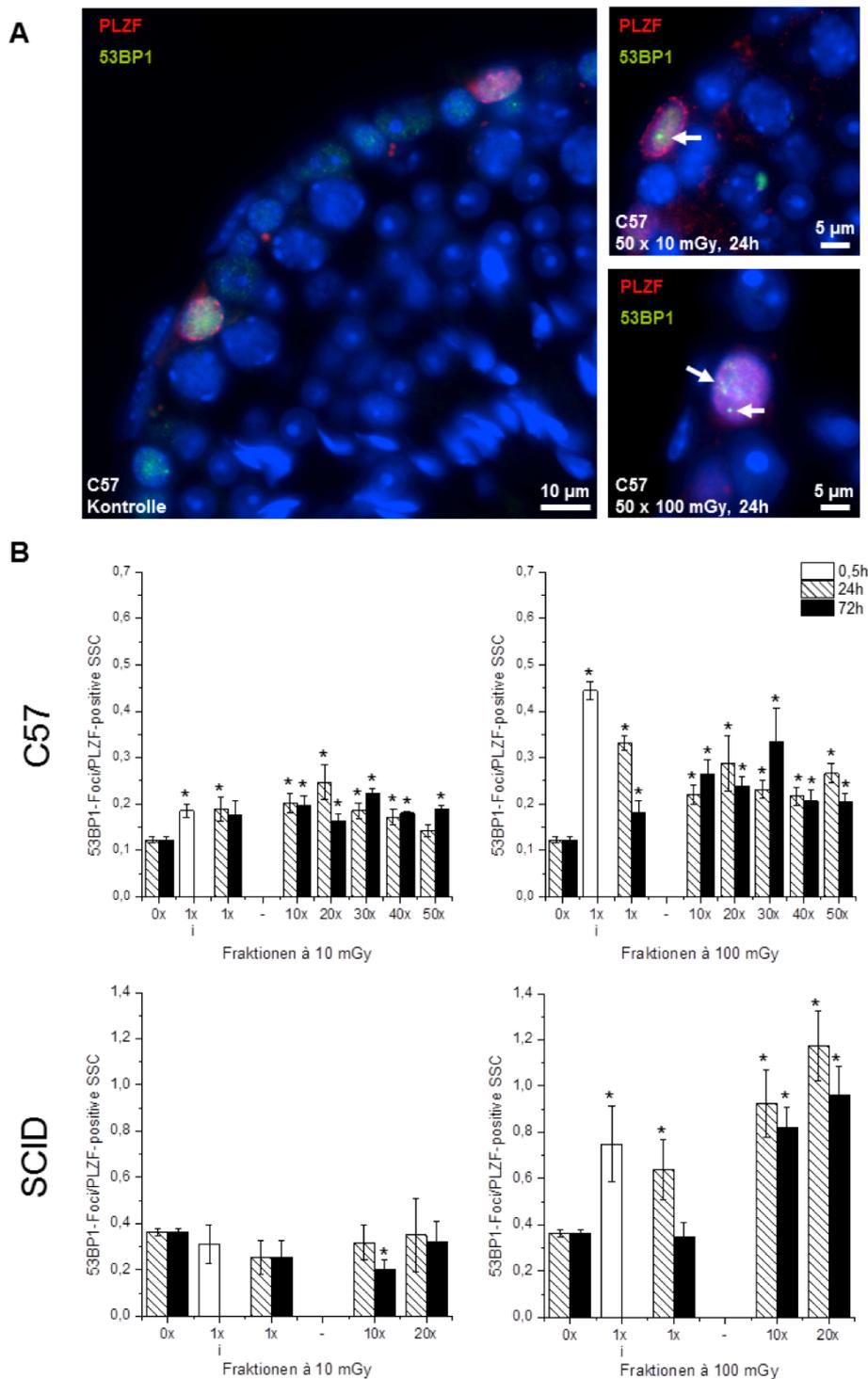
Zur Untersuchung der DNA-Reparatur in SSCs im Hodengewebe von Mäusen wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen PLZF zur Identifikation der SSCs und gegen 53BP1 zur Markierung von DSBs durchgeführt. 53BP1 sammelt sich in Foci an DSBs und ist nach Immunfluoreszenzfärbung als kleine Punkte zu erkennen (Abb. 4.5 A, grün, Pfeile). Es sind drei Färbungen von Gewebeschnitten von C57-Mäusen, repräsentativ für eine unbestrahlte Kontrolle und zwei bestrahlte Mauspräparate (50 x 10 mGy und 50 x 100 mGy jeweils nach 24 h), dargestellt. Die Färbung der Kontrolle lässt deutlich zwei PLZF-positive Zellen (rot) erkennen, die unterschiedlich stark für 53BP1 (grün) positiv sind, wobei keine Foci zu erkennen sind (Abb. 4.5 A). Die Aufnahmen der bestrahlten Gewebeproben zeigen hingegen deutliche 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs (Abb. 4.5 A, Pfeile). Insgesamt wurden für den C57-Stamm drei biologische Replikate untersucht und für den SCID-Stamm zwei biologische und jeweils ein technisches Replikat. Es wurden mindestens 40 Zellen und 40 Foci in den untersuchten Replikaten ausgezählt.

Die Diagramme in Abbildung 4.5 B fassen die Analyse der Daten für die fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung mit 10 (links) und 100 mGy (rechts) des C57- (oben) und des SCID-Stammes (unten) zusammen. Die Gewebe wurden 24 bzw. 72 h nach der letzten Bestrahlungsfraction fixiert. Um eine Aussage über unmittelbar nach einer Einmalbestrahlung mit 10 bzw. 100 mGy induzierte DSBs treffen zu können, wurden zusätzlich Gewebe nach 0,5 h fixiert und analysiert (Abb. 4.5 B).

Bei den C57-Mäusen ist nach einer Einmalbestrahlung von 10 mGy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle sowohl nach 0,5 als auch nach 24 und 72 h eine signifikante Zunahme der 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs um 51, 54 bzw. 43 % festzustellen ( $p \leq 0,05$ ). Die Anzahl der 53BP1-Foci in den SSCs ist zu allen weiteren untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (in Abb. 4.5 B als 0 x 10 bzw. 100 mGy gekennzeichnet) um mind. 17 % erhöht ( $p \leq 0,05$ ). Nach 20 x 10 mGy ist die Zunahme der Anzahl der 53BP1-Foci im Vergleich zur Kontrolle mit 101 % maximal. Eine Bestrahlungsdosis von 100 mGy führt zu einer noch deutlicheren Zunahme der Anzahl der 53BP1-Foci in den untersuchten SSCs ( $p \leq 0,05$ ). 0,5 h nach Einmalbestrahlung zur Induktion

von DSBs ist die Anzahl der 53BP1-Foci im Vergleich zur Kontrolle um 263 % erhöht. Auch im Vergleich zu der geringeren Dosis von 10 mGy ist 0,5 h nach der Einmalbestrahlung eine um 240 % größere Anzahl von 53BP1-Foci festzustellen. 24 bzw. 72 h nach 10, 20, 30, 40 und 50 x 100 mGy verbleibt die Anzahl der 53BP1-Foci auf einem hohen Niveau, wobei die Zunahme 72 h nach 30 x 100 mGy mit 274 % maximal ist ( $p \leq 0,05$ ). Während der fortlaufenden fraktionierten Bestrahlung mit 100 mGy ist die Anzahl der 53BP1-Foci zu jedem Zeitpunkt größer als in der unbestrahlten Kontrolle als auch nach Bestrahlung mit 10 mGy.

Bei den SCID-Mäusen hat die Einmalbestrahlung von 10 mGy zur Induktion von DSBs weder 0,5 noch 24 bzw. 72 h nach Bestrahlung signifikante Veränderungen der Anzahl der 53BP1-Foci in den untersuchten SSCs zur Folge. Nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 mGy sind nur geringfügige Veränderungen festzustellen, wobei die Abnahme der Anzahl der 53BP1-Foci um 13 % 72 h nach 10 x 10 mGy signifikant ist ( $p \leq 0,05$ ). Im Vergleich zu den C57-Mäusen ist die Anzahl der 53BP1-Foci nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit 10 mGy in den untersuchten SCID-Mäusen um bis zu zwei Mal größer, bzgl. der unbestrahlten Kontrolle ist eine dreifach höhere Anzahl von 53BP1-Foci bei SCID-Mäusen zu beobachten (Abb. 4.5 B). Eine höhere Bestrahlungsdosis von 100 mGy führt 0,5 und 24 h nach Einmalbestrahlung zu einer Zunahme der Anzahl der 53BP1-Foci in SSCs um 75 bzw. 105 % ( $p \leq 0,05$ ). Nach 10 wie auch 20 x 100 mGy nimmt die Anzahl der 53BP1-Foci im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zu und übersteigt das Niveau der Einmalbestrahlungen ( $p \leq 0,05$ ). Eine maximale Zunahme um 221 % ist 24 h nach 20 x 100 mGy zu erkennen. Im Vergleich zu den C57-Mäusen ist die Anzahl der 53BP1-Foci nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit 100 mGy in den untersuchten SCID-Mäusen für alle untersuchten Gewebeproben um bis zu vier Mal größer (Abb. 4.5 B).



**Abb. 4.5: Quantifizierung der 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs**

**A** Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten einer C57-Kontrollmaus und bestrahlten C57-Mäusen (50 x 10 bzw. 100 mGy, jeweils 24 h nach letzter Bestrahlung) Blau: Zellkerne, Rot: PLZF-positive SSCs, Grün: 53BP1 zur Markierung von DSBs. **B** Anzahl der 53BP1-Foci pro PLZF-positiver Zelle in C57- (oben) und SCID-Mäusen (unten). Auf der y-Achse ist die Anzahl der 53BP1-Foci pro PLZF-positiver Zelle, auf der x-Achse sind die jeweils untersuchten Bestrahlungsfractionen aufgetragen. Die Gewebe wurden 24 (weiß, diagonal gestreift) bzw. 72 h (schwarz), zusätzlich 0,5 h nach Einmalbestrahlung (weiß, gekennzeichnet mit „i“) nach der letzten Bestrahlung fixiert. Linke Diagramme: Bestrahlung mit 10 mGy. Rechte Diagramme: Bestrahlung mit 100 mGy. Signifikanz nach Mann-Whitney (jeweils in Bezug zur Kontrolle): \*  $p \leq 0,05$ . Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

#### 4.4 Regeneration nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung

Der Epithelzyklus eines Tubulus im Maushoden beträgt ca. 35 Tage (Oakberg, 1956). Nach dieser Zeit ist eine Stammzelle zu einem fertigen Spermium gereift. Nachdem eine fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung mit einer Dosis von 100 mGy bei C57-Mäusen zu einer deutlichen Verkleinerung der CSA (Abb. 4.1) sowie zu einer Abnahme der Anzahl der PLZF-positiven SSCs (Abb. 4.2) und proliferierenden Zellen (Abb. 4.3) geführt hat, wurde die Regenerationsfähigkeit des geschädigten Gewebes untersucht. Die Strahlungseffekte waren 24 h nach einer Bestrahlung von 50 x 100 mGy am größten, weshalb zur Untersuchung der Regeneration C57-Mäuse 35 und 70 Tage nach 50 x 100 mGy untersucht wurden.

Es wurden jeweils drei biologische Replikate nach 35 und 70 Tagen hinsichtlich ihrer CSA, der Anzahl der PLZF- und Ki67-positiven Zellen sowie der Anzahl der 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs untersucht.

##### 4.4.1 Bestimmung der Tubulusquerschnittsfläche

Nach einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung mit 30 bzw. 50 x 100 mGy war eine Abnahme der CSA um 33 bzw. 56 % festzustellen (Abb. 4.1;  $p \leq 0,05$ ). Die Untersuchungen 35 und 70 Tage nach 50 x 100 mGy ergaben im Vergleich zur Kontrolle eine Größenzunahme um 35 bzw. 70 %. Im Vergleich zur Größe der CSA 24 h nach 50 x 100 mGy ist eine Vergrößerung um 210 bzw. 290 % 35 bzw. 70 Tage nach der letzten Bestrahlung festzustellen (Abb. 4.6 A;  $p \leq 0,05$ ). Zwischen Tag 35 und Tag 70 nimmt die Größe der CSA um 26 % zu (Abb. 4.6 A;  $p \leq 0,05$ ). Es wurden jeweils 100 Tubuli in den drei untersuchten biologischen Replikaten ausgemessen.

Da das Alter der Mäuse nach den Regenerationsperioden von 35 und 70 Tagen das der Kontrollmäuse um etwa 4 bzw. 5 Monate übersteigt, wurde zusätzlich die CSA ausgewachsener 12 Monate alter Kontrollmäuse untersucht. Die CSA der 12 Monate alten Kontrollmäuse ( $0,026 \pm 0,003 \text{ mm}^2$ ) war geringfügig größer als die 2 Monate alten Kontrollmäuse ( $0,022 \pm 0,003 \text{ mm}^2$ ). Die Ergebnisse der Messungen der CSA 35 wie auch 70 Tage nach einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung mit 50 x 100 mGy übersteigen die für beide Kontrollgruppen gemessenen Werte signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4.4.2 Identifizierung und Quantifizierung der SSCs anhand des PLZF-Markerproteins**

Die Anzahl der PLZF-positiven SSCs pro Tubulus nimmt in C57-Mäusen mit fortlaufender fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung um bis zu 75 % ab (Abb. 4.2;  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,001$ ). Nach 35 bzw. 70 Tagen Regeneration nach 50 x 100 mGy nimmt die Anzahl der SSCs pro Tubulus im Vergleich zu 24 h (= 1 d) nach 50 x 100 mGy um 160 bzw. 264 % zu (Abb. 4.6 B;  $p \leq 0,01$ ). Die Zunahme der Anzahl der SSCs pro Tubulus zwischen 35 und 70 Tagen um 40 % ist ebenfalls signifikant (Abb. 4.6 B;  $p \leq 0,05$ ). Die Anzahl der PLZF-positiven SSCs, die für die Kontrolltiere ( $1,6 \pm 0,3$ ) bestimmt wurde, wird auch nach 70-tägiger Regeneration ( $1,4 \pm 0,04$ ) nicht erreicht (Abb. 4.6 B;  $p \leq 0,05$ ). Es wurden 50 Tubuli von drei biologischen Replikaten hinsichtlich der Anzahl der PLZF-positiven Zellen untersucht.

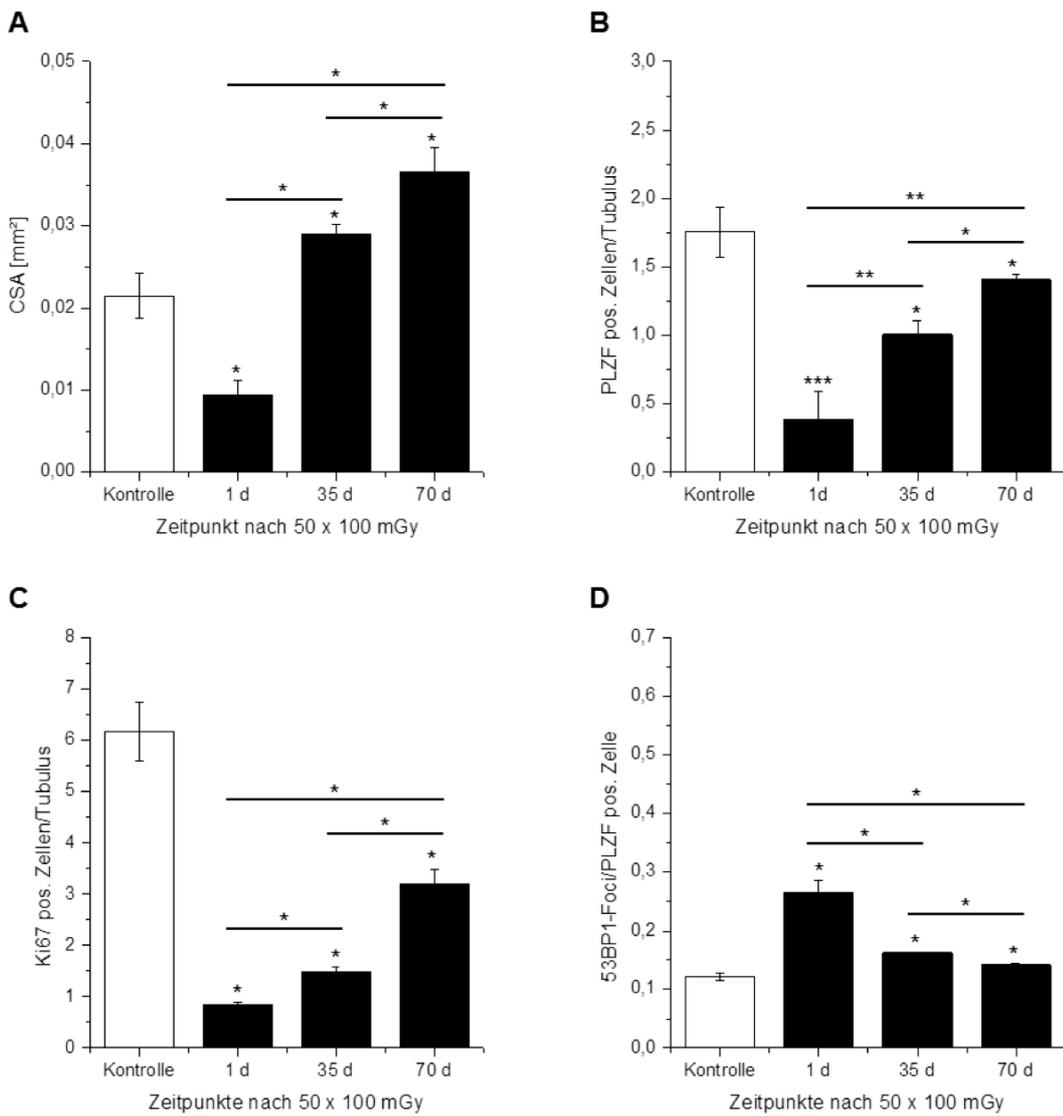
#### **4.4.3 Untersuchung der Proliferation anhand des Ki67-Markerproteins**

Die Anzahl Ki67-positiver Zellen pro Tubulus nimmt während einer fortlaufenden fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung mit 10 bzw. 100 mGy um bis zu 92 % ab (Abb. 4.3;  $p \leq 0,05$ ). 35 bzw. 70 Tage nach 50 x 100 mGy ist eine Zunahme um 75 bzw. 276 % im Vergleich zu der 24 h nach 50 x 100 mGy erhobenen Anzahl Ki67-positiver Zellen festzustellen (Abb. 4.6 C;  $p \leq 0,05$ ). Die Regenerationszeitpunkte vergleichend ergibt sich eine Zunahme der Anzahl Ki67-positiver Zellen im Gewebe um 115 % (Abb. 4.6 C;  $p \leq 0,05$ ). Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle sind nach 35 Tagen 76 %, nach 70 Tagen 48 % weniger Zellen pro Tubulus für Ki67 positiv (Abb. 4.6 C;  $p \leq 0,05$ ). Es wurden je 50 Tubuli von drei biologischen Replikaten hinsichtlich der Anzahl der Ki67-positiven Zellen untersucht.

#### **4.4.4 Quantifizierung der residualen 53BP1-Foci in SSCs**

Die Quantifizierung der 53BP1-Foci während einer fortlaufenden fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung ergab sowohl für eine Dosis von 10 als auch 100 mGy eine signifikante Zunahme der Anzahl in PLZF-positiven SSCs (Abb. 4.5;  $p \leq 0,05$ ). Nach Regenerationsperioden von 35 bzw. 70 Tagen nimmt die Anzahl

der 53BP1-Foci in SSCs im untersuchten Gewebe im Vergleich zu dem 24 h nach 50 x 100 mGy erhobenen Wert um 39 bzw. 47 % ab (Abb. 4.6 D;  $p \leq 0,05$ ). Nach 70 Tagen ist im Vergleich zu dem nach 35 Tagen erhobenen Wert eine um 13 % geringere Anzahl von 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs festzustellen (Abb. 4.6 D;  $p \leq 0,05$ ). Insgesamt ist 35 bzw. 70 Tage nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit 50 x 100 mGy im Vergleich zur Kontrolle eine um 33 bzw. 16 % höhere Anzahl von 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs zu beobachten (Abb. 4.6 D;  $p \leq 0,05$ ). Es wurden jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci in insgesamt drei biologischen Replikaten ausgezählt.



**Abb. 4.6: Regeneration murinen Hodengewebes**

In den Diagrammen A bis D gibt die y-Achse den jeweils untersuchten Aspekt an. Auf der x-Achse sind die Kontrolle und die untersuchten Zeitpunkte nach 50 x 100 mGy (1 d, 35 d und 70 d) zu sehen. **A** CSA. **B** Anzahl der PLZF-positiven Zellen pro Tubulus. **C** Anzahl der Ki67-positiven Zellen pro Tubulus. **D** Quantifizierung der 53BP1-Foci in PLZF-positiven Zellen. Signifikanz nach Mann-Whitney (in Bezug zur Kontrolle und unter den einzelnen untersuchten Zeitpunkten): \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. CSA = *cross sectional area*, engl. für Querschnittsfläche, d = days, engl. für Tage.



## 5 Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der Auswirkungen einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf murines Hodengewebe zweier verschiedener Mausstämmen. Hierzu wurde das Gewebe im Rahmen einer Ganzkörperbestrahlung *in vivo* bestrahlt und anschließend hinsichtlich verschiedener Aspekte untersucht. Übersichtsfärbungen von Tubulusquerschnitten bestrahlter Hodengewebeproben ließen einen deutlichen Zellverlust mit zunehmender Bestrahlungsfraction erkennen. Die Untersuchung nach fraktionierter Bestrahlung mit 100 mGy ergab eine Verkleinerung der CSA. In Zusammenhang damit wurden die Anzahl der SSCs und die der proliferierenden Zellen im Tubulusquerschnitt mit Hilfe von Markerproteinen untersucht. Nach fraktionierter Bestrahlung mit einer Dosis von 10 bzw. 100 mGy je Fraktion nimmt die Anzahl der PLZF-positiven SSCs und die der Ki67-positiven Zellen pro Tubulus ab. Weiterhin wurden apoptotische Zellen mittels des Markerproteins PARP1 im Tubulusquerschnitt quantifiziert. Die Änderung der Anzahl der PARP1-positiven Zellen pro Tubulus ist auch mit zunehmender Bestrahlungsfraction nicht signifikant. Zur Untersuchung der DNA-Reparatur wurde das Vorkommen des Markerproteins 53BP1 untersucht. Hierzu wurden die 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs quantifiziert. Nach Bestrahlung war in SSCs eine Zunahme der Anzahl der 53BP1-Foci festzustellen.

### 5.1 Auswirkungen einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf murines Hodengewebe

Nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung konnte im Gewebe von C57- und SCID-Mäusen ein deutlicher Zellverlust bzw. eine desorganisiert wirkende Zellordnung innerhalb eines Tubulus festgestellt werden. Der nach Bestrahlung zu beobachtende Zellverlust im Hodengewebe von C57-Mäusen steht in Einklang mit veröffentlichten Untersuchungen, in denen auch andere Tierarten untersucht wurden (de Ruiter-Bootsma *et al.*, 1977; Huckins und Oakberg, 1978; Pineau *et al.*, 1989; van der Meer *et al.*, 1993; Jahnukainen *et al.*, 2007). Bördlein und Kollegen haben den Zellverlust in SPOC1-defizienten Mäusen untersucht. SPOC1 ist für die SSC-Differenzierung und eine kontinuierliche Spermatogenese unverzichtbar (Bördlein *et al.*, 2011). Der Zellverlust in Tubuli von SPOC1-defizienten Mäusen hatte eine Verkleinerung der CSA zur Folge. Die Zellzahl innerhalb eines

Tubulus steht folglich in Korrelation mit seiner CSA, weshalb diese als indirektes Maß für die Zellzahl herangezogen werden kann. Um festzustellen, ab welcher Bestrahlungsdosis eine Verkleinerung der CSA zu beobachten ist, wurde die CSA nach 10, 30 und 50 x 10 bzw. 100 mGy für den C57-Stamm und nach 10 und 20 x 10 bzw. 100 mGy für den strahlensensitiveren SCID-Stamm bestimmt. Nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 mGy waren bei beiden Mausstämmen keine Veränderungen der CSA festzustellen. Ab einer Bestrahlung von 30 x 100 mGy war eine Verkleinerung der CSA bei den C57-Mäusen deutlich. Bei den untersuchten SCID-Mäusen hingegen war nach 20 x 100 mGy eine desorganisiert wirkende Zellanordnung zu erkennen und keine deutliche Verkleinerung, was auf die geringere Anzahl der auf den SCID-Stamm einwirkenden Bestrahlungseinheiten und somit der geringeren Gesamtstrahlenbelastung (5 Gy (C57) vs. 2 Gy (SCID)) zurückzuführen sein könnte. Eine Untersuchung von SCID-Mäusen nach länger andauernder Bestrahlung könnte Aufschluss darüber geben, ob und in welchem Ausmaß sich der Trend der verringerten CSA fortsetzt. Ein solcher Versuch ist allerdings kritisch zu betrachten, da eine längere Bestrahlungsdauer ein höheres Stresspotential durch Transport und Bestrahlung und somit eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bedeutet. Weiterhin ist die Reparatur strahleninduzierter DNA-Läsionen durch die Mutation der DNA-PK<sub>cs</sub> eingeschränkt.

Als Ursache für die veränderte Zellanordnung in Hodengewebe von SCID-Mäusen sowie die Verkleinerung der CSA im Hodengewebe von C57-Mäusen könnte eine Abnahme der Anzahl der SSCs in den Tubuli in Frage kommen. Die SSCs liefern die für die Spermatogenese essentiellen Tochterzellen, die während des Epithelzyklus eines Tubulus zu Spermatozoen heranreifen. Spermatogonien sind im Vergleich zu anderen Keimzellstadien und den interstitiellen Zellen radiosensitiver (zitiert nach Fogg und Cowing, 1951), was durch mehrere Studien bestätigt wurde (Shaver *et al.*, 1953; Oakberg, 1955; Oakberg, 1959; van Beek *et al.*, 1984; Meistrich *et al.*, 1984; Ahmed *et al.*, 2007). Die Anzahl der SSCs in Tubuli bestrahlter Mäuse wurde in Gewebeschnitten quantifiziert, in denen das SSC-Markerprotein PLZF mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass fraktionierte Bestrahlungen über mehrere Wochen mit 10 bzw. 100 mGy je Fraktion bei beiden Mausstämmen zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl der SSCs im Hodengewebe führt, was frühere Aussagen über eine Abnahme der Stammzellzahl nach (fraktionierter) Bestrahlung bestätigt

(de Ruiter–Bootsma *et al.*, 1977; Meistrich *et al.*, 1984; de Rooij *et al.*, 1989; van der Meer *et al.*, 1993). Durch den mit fortlaufender Bestrahlung immer kleiner werdenden Stammzellpool innerhalb des Hodens verringert sich folglich die Gesamtzellzahl innerhalb eines Tubulus. Dieser Zellverlust ist für die messbare Verkleinerung der CSA von Tubuli murinen Hodengewebes mitverantwortlich.

Die Radiosensitivität des Hodengewebes, die stark von dem zum Bestrahlungszeitpunkt herrschenden Epithelstadium des bestrahlten Tubulus und somit vom Zellzyklus einzelner Zellen abhängig ist (Bianchi *et al.*, 1985; van Beek *et al.*, 1986a, b; van der Meer *et al.*, 1992, 1993; Liu *et al.*, 2007; Cordelli *et al.*, 2012), spielt ebenfalls eine Rolle. Die Reaktionen der verschiedenen Keimzellstadien innerhalb eines Tubulus auf ionisierende Strahlung können somit unterschiedlich ausfallen. Zur Vermeidung der Weitergabe falsch reparierten DNA–Materials an Tochterstammzellen innerhalb des Selbsterneuerungsprozesses könnten sich SSCs zu differenzierenden Spermatogonien weiterentwickeln und somit ihren Stammzellcharakter und ihre PLZF–Positivität verlieren. Dies erscheint durch die abnehmende Anzahl PLZF–positiver SSCs und da keine Apoptose in SSCs beobachtet werden konnte naheliegend. Die Proliferation differenzierender Spermatogonien bei vorliegenden DNA–Schäden kann weiterhin durch einen Zellzyklusarrest gehemmt werden, wodurch die Weitergabe des defekten DNA–Materials an nachfolgende Zellstadien unterbunden wird. Während dieser Arbeit wurde der Aspekt der Proliferation indirekt über die Quantifizierung Ki67–positiver Zellen pro Tubulus untersucht. Die Anzahl Ki67–positiver Zellen pro Tubulus nimmt sowohl bei Mäusen des C57– als auch des SCID–Stammes mit zunehmender Bestrahlungsfraction und somit –dosis ab. Durch die verringerte Proliferation wird verhindert, dass falsch oder noch nicht vollständig reparierte DNA–Schäden an nachfolgende Zellstadien weitergegeben werden. Folglich ist die Abnahme der Anzahl Ki67–positiver Zellen neben der Abnahme der Anzahl PLZF–positiver SSCs als eine weitere Ursache der zu beobachtenden Verkleinerung der CSA anzunehmen.

Neben der verringerten Proliferation stellt die Apoptose eine weitere Möglichkeit dar, die Weitergabe von defektem DNA–Material zu verhindern. Die Apoptose kann unter anderem in Zellen mit irreparablen DNA–Schäden eingeleitet werden um das Erbgut zu schützen (van der Meer *et al.*, 1992, 1993). Während dieser Arbeit wurde das Markerprotein PARP1, das während der Apoptose durch Caspase 3 gespalten wird, zur Untersuchung der Apoptose 24 h nach der letzten Bestrah-

lung einer fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung herangezogen. Die Expression im Tubulus von Caspase 3, ein anerkanntes Markerprotein für die Apoptose, erreicht bereits 5 h nach einer Einmalbestrahlung mit 2 Gy sein Maximum (Rübe *et al.*, 2011). Die Quantifizierung von PARP1-positiven Zellen in bestrahlten Tubuli zeigte ihr Maximum 24 h nach der Bestrahlung (Rübe *et al.*, 2011), weshalb dieses Protein zur Untersuchung der Apoptose 24 h nach der letzten Bestrahlung einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung besser geeignet war. Der verwendete Antikörper gegen PARP1 ist für das während der Apoptose auftretende Spaltprodukt spezifisch (Kaufmann *et al.*, 1993). Die Auswertung der Auszählung PARP1-positiver Zellen pro Tubulus im Vergleich zur Kontrolle ergab für C57-Mäuse keine signifikanten Veränderungen nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit 10 bzw. 100 mGy je Fraktion. Bei Mäusen des SCID-Stammes war eine verringerte Anzahl PARP1-positiver Zellen 24 h nach 10 x 10 bzw. 100 mGy und 24 h nach 20 x 100 mGy festzustellen. Die unterschiedliche Anzahl apoptotischer Zellen zwischen den beiden untersuchten Stämmen in der Kontrolle und nach 10-facher Bestrahlung ist möglicherweise auf Stammesunterschiede oder eine veränderte Schadensantwort der SCID-Mäuse durch die Mutation in der NHEJ zu begründen (Rübe *et al.*, 2011; Abuelhija *et al.*, 2012, 2013). Um die Apoptose nach Bestrahlung in Keimzellen näher zu charakterisieren, sind weitere Untersuchungen notwendig. Eine einzelne Methode ist nicht ausreichend aussagekräftig, um die Apoptose in Keimzellen, insbesondere in SSCs, zu untersuchen (Liu *et al.*, 2007).

Bei den bisher diskutierten Ergebnissen handelt es sich um absolute Zahlen. Eine Betrachtung der Ergebnisse relativ zur Gesamtzellzahl des Tubulus könnte weitere Erkenntnisse liefern. Dies bedarf allerdings weiterführender Experimente, bei denen die Gesamtzellzahl jedes untersuchten Tubulus erfasst wird. Es wäre beispielsweise möglich, dass die Anzahl PARP1-positiver Zellen relativ zur Gesamtzellzahl des Tubulus mit steigender Bestrahlungsfraction zunimmt, was bei der Betrachtung der absoluten Zahlen nicht zu bewerten ist.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bezüglich der Strahlensensitivität einer Zelle ist die Effizienz von DNA-Reparaturmechanismen innerhalb der Zelle. Die DNA-Reparatureffizienz nimmt von somatischen Zellen über Spermatozyten und runde Spermatiden bis hin zu den Spermatogonien ab (Ahmed *et al.*, 2007), wodurch die Radiosensitivität zu den Spermatogonien hin zunimmt. Neben den undifferenzier-

ten SSCs sind differenzierende Spermatogonien ebenfalls sehr radiosensitiv und gehen nach Bestrahlung vermehrt in Apoptose (van der Meer *et al.*, 1992, 1993). Spermatozyten können sich in Folge von Bestrahlung nicht mehr richtig weiterentwickeln, wodurch die Anzahl der runden und elongierten Spermatiden abnimmt (Rowley *et al.*, 1974). Dies sind weitere Bestätigungen für die Komplexität der Reparatur strahleninduzierter DSBs, die durch verschiedene Mechanismen, an denen eine Vielzahl von Reparaturproteinen beteiligt sind, bewerkstelligt wird.

Neben  $\gamma$ H2AX ist 53BP1 ein anerkanntes Markerprotein für DSBs (Schultz *et al.*, 2000; Zhang, Dissertation 2010; Rube *et al.*, 2011; Schanz & Schuler *et al.*, 2012). In der Immunfluoreszenz sind beide Proteine nach Markierung mit spezifischen Antikörpern als Foci zu erkennen, wodurch eine indirekte Untersuchung der DSBs nach verschiedenen Bestrahlungseinheiten ermöglicht wird. Nach andauernder fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung ist ein Anstieg des 53BP1-Focilevels in verschiedenen Zelltypen festzustellen, wobei sowohl langsam als auch schnell proliferierende Gewebe untersucht wurden (Schanz & Schuler *et al.*, 2012). Nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit 50 x 100 mGy war in verschiedenen nicht oder langsam proliferierenden Geweben eine Akkumulation von 53BP1-Foci festzustellen (Schanz & Schuler *et al.*, 2012). Die Quantifizierung der 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs ließ nach 50 x 100 mGy ein erhöhtes Focilevel im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle erkennen. Jedoch war, wie z. B. in kortikalen Neuronen (Schanz & Schuler *et al.*, 2012), keine Akkumulation zu beobachten. Die Hypothese einer effizienten DNA-Reparatur in undifferenzierten SSCs wird unterstützt durch das geringere 53BP1-Focilevel in SSCs im Vergleich zu anderen Zelltypen zusammen mit der Feststellung, dass SSCs im Vergleich zu differenzierenden Spermatogonien weniger radiosensitiv sind (Zhang, Dissertation 2010).

Ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der Untersuchungen des C57- und des SCID-Stammes zeigte hinsichtlich der unbestrahlten Kontrolle und der bis zu 20 Mal bestrahlten Proben ein niedrigeres 53BP1-Focilevel bei C57-Mäusen. Dies kann teilweise durch die Beeinträchtigung der DNA-Reparatur aufgrund einer Mutation der DNA-PK<sub>cs</sub>, einem Kernprotein der NHEJ, erklärt werden. Durch die Mutation der DNA-PK<sub>cs</sub> wird die Aktivierung von an der NHEJ beteiligtem Artemis beeinträchtigt, wodurch die DNA-Reparatur nicht mehr effizient funktioniert. Die Aufgabe der DNA-PK<sub>cs</sub> kann allerdings durch andere, der Familie der

PI3K zugehörigen Kinasen übernommen werden und somit die DNA-Reparatur, wenn auch langsamer, gewährleisten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden durch eine Untersuchung bestrahlten Hodengewebes verschiedener Rattenstämme bekräftigt (Abuelhija *et al.*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Stamm- und nachfolgenden Zellen nach Bestrahlung durch vermehrten Zelltod von SSCs, Inhibition der spermatogonischen Differenzierung, eine hormonelle Umstellung sowie das geschädigte somatische Umfeld bedingt war (Abuelhija *et al.*, 2013). Der Zellverlust in allen untersuchten Stämmen war dosisabhängig, das Ausmaß des Zellverlusts hingegen in Abhängigkeit des Stammes (Abuelhija *et al.*, 2013). Untersuchungen hinsichtlich des Hormonhaushalts, der Zelldifferenzierung und der Apoptose der Keim- sowie der somatischen Zellen könnten weitere Erkenntnisse bzgl. der Auswirkungen einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf murines Hodengewebe hervorbringen.

## **5.2 Regeneration bestrahlten Hodengewebes nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung**

Die Regeneration bestrahlten Hodengewebes ist in der Klinik von großer Bedeutung, da auch junge Menschen Neoplasmen entwickeln können und einer Strahlen- und/oder Chemotherapie unterzogen werden müssen. Niedrige Dosen sind hinsichtlich einer Strahlentherapie ebenfalls von Interesse, da neben Tumorgewebe auch immer gesundes Gewebe mit niedrigeren Dosen belastet wird. Um einen Einblick in die Regenerationsfähigkeit bestrahlten Hodengewebes zu erlangen, wurden insgesamt sechs C57-Mäuse 35 bzw. 70 Tage nach einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung mit 50 x 100 mGy untersucht. Die Regenerationszeiträume entsprechen einem bzw. zwei Epithelzyklen eines murinen Tubulus.

Zunächst wurde die CSA zu den festgesetzten Regenerationszeitpunkten bestimmt. In Abbildung 4.6 ist nach 35 bzw. 70 Tagen nach der letzten Bestrahlung eine deutliche Vergrößerung der CSA im Vergleich zu 24 h nach 50 x 100 mGy zu erkennen. Weiterhin übersteigt die CSA zu beiden Regenerationszeitpunkten die Größe der CSA der unbestrahlten Kontrolle. Eine altersabhängige Vergrößerung der CSA konnte ausgeschlossen werden, nachdem zusätzlich die CSA 12 Monate alter Kontrolltiere bestimmt wurde. 24 h nach der fraktionierten Niedrig-

dosisbestrahlung mit 50 x 100 mGy ist ein massiver Zellverlust zu beobachten, den es auszugleichen gilt. Die Vergrößerung der CSA zu den Regenerationszeitpunkten über das Niveau der Kontrolltiere hinaus könnte mit einem sehr starken Selbsterhaltungsimpuls des Gewebes zusammenhängen. Der Stammzellpool wird vergrößert, die Proliferation des Gewebes nimmt zu, was die Zunahme der Zellzahl innerhalb der Tubuli und somit die Vergrößerung der CSA bedingt. Dies konnte durch die Quantifizierung der SSCs und der Proliferation mittels PLZF- bzw. Ki67-Antikörpern bestätigt werden. Die Auswertung zeigte einen Anstieg der Anzahl PLZF- als auch Ki67-positiver Zellen im Gewebequerschnitt, was auf eine Erholung des Gewebes 35 bzw. 70 Tage nach der letzten Bestrahlung schließen lässt. Die Ausgangswerte der unbestrahlten Kontrollen werden allerdings in beiden Fällen nicht erreicht. Zum Erhalt der Reproduktionsfähigkeit muss das Gewebe den nach der Bestrahlung zu beobachtenden Zellverlust, der über die Bestimmung der CSA dargestellt werden konnte, ausgleichen. Eine Steigerung der Anzahl der SSCs über den Selbsterneuerungsprozess ist eine Möglichkeit um den Stammzellpool zu regenerieren. Ebenso ist eine, im Vergleich zu 24 h nach 50 x 100 mGy, gesteigerte Anzahl Ki67-positiver Zellen ein Indiz für die Regenerationsfähigkeit des Hodengewebes. Um eine vollständige Regeneration des bestrahlten Hodengewebes hinsichtlich der Anzahl PLZF-positiver SSCs sowie der Proliferation zu erreichen, könnte eine Verlängerung der Regenerationsperiode um weitere 35 Tage ausreichend sein. Dies wäre allerdings in weiteren Experimenten zu untersuchen.

Betrachtet man die Anzahl der 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs so ist festzustellen, dass diese während der Regenerationsperioden von 35 bzw. 70 Tagen im Vergleich zu dem Wert 24 h nach 50 x 100 mGy signifikant abnimmt. Der Referenzwert der unbestrahlten Kontrolle wird allerdings zu beiden Regenerationszeitpunkten nicht erreicht. Es sind weiterhin residuale 53BP1-Foci in den SSCs zu beobachten. Bisher wurden noch keine Langzeituntersuchungen hinsichtlich verbleibender 53BP1-Foci in PLZF-positiven SSCs mehrere Wochen oder Monate nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung unternommen, was die Notwendigkeit der vorliegenden Untersuchungen unterstreicht. Eine Verlängerung der Regenerationsperiode könnte Aufschluss darüber geben, ob sich das Gewebe vollständig von der Bestrahlung erholt und die Anzahl von 53BP1-Foci den Kontrollwert erreicht.

Die hier diskutierten Ergebnisse stehen in Einklang mit der Literatur. Hodengewebe ist sehr strahlenempfindlich und benötigt im Vergleich zu anderen Geweben längere Zeit zur Regeneration. Andere sich teilende Gewebearten, wie z. B. Magen- oder Darmschleimhaut, sind dazu in der Lage, den nach Bestrahlung mit vergleichbarer Dosis auftretenden Zellverlust zu reduzieren und die Stammzellpopulation kurze Zeit nach der Bestrahlung zu regenerieren (Withers, 1971; Chen und Withers, 1972). Bis zu 33 Tage nach einer Einmalbestrahlung mit 4 Gy konnte in C57-Mäusen eine Abnahme der Zellzahl und des Gewichts der Hoden festgestellt werden (Cordelli *et al.*, 2012). Nach einer Regenerationsdauer von 45 Tagen war eine erste Erholung des Gewebes in Form einer Zunahme der Anzahl runder Spermatozoen festzustellen, was auf die Spermatozoogenese verbleibender SSCs zurückzuführen war (Cordelli *et al.*, 2012). Bezüglich humanen Hodengewebes ist bekannt, dass dieses je nach Strahlenbelastung Jahre zur vollständigen Regeneration benötigt, falls die Bestrahlungsdosis nicht zu irreversiblen Schäden des Gewebes geführt hat und somit zu dauerhafter Infertilität (Ash, 1980).

Verpaarungen mit weiblichen Mäusen und Untersuchungen des Hormonhaushalts könnten weitere Erkenntnisse über die Regenerationsfähigkeit und Fertilität bestrahlten Hodengewebes liefern. Weiterhin wäre es möglich, nach erfolgreicher Verpaarung den Gesundheitszustand der Nachkommen auch in Hinblick auf DNA-Schäden und Mutationen zu untersuchen.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Abuelhija M, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML (2012) Differences in radiation sensitivity of recovery of spermatogenesis between rat strains. *Toxicol Sci.*, 126:545–553.
2. Abuelhija M, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML (2013) Rat models of post-irradiation recovery of spermatogenesis: interstrain differences. *Andrology.*, 1:206–215.
3. Adams MM, Carpenter PB (2006) Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1. *Cell Div.*, 1:19.
4. Ahmed EA, van der Vaart A, Barten A, Kal HB, Chen J, Lou Z, Minter-Dykhouse K, Bartkova J, Bartek J, de Boer P, de Rooij DG (2007) Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repair.*, 6:1243–1254.
5. Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG, van Pelt AM (2005) Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS.*, 113:727–742.
6. Ash P (1980) The influence of radiation on fertility in man. *Br J Radiol.*, 53:271–278.
7. Belling KC, Tanaka M, Dalgaard MD, Nielsen JE, Nielsen HB, Brunak S, Almstrup K, Leffers H (2013) Transcriptome profiling of mice testes following low dose irradiation. *Reprod Biol Endocrinol.*, 11:50.
8. Bianchi M, Delic JI, Hurtado-de-Catalfo G, Hendry JH (1985) Strain Differences in the Radiosensitivity of Mouse Spermatogonia. *Int J Radiat Biol.*, 48: 579–588.
9. Bhogal N, Jalali F, Bristow RG (2009) Microscopic imaging of DNA repair foci in irradiated normal tissues. *Int J Radiat Biol.*, 85:732–746.

10. Bördlein A, Scherthan H, Nelkenbrecher C, Molter T, Bösl MR, Dippold C, Birke K, Kinkley S, Staeger H, Will H, Winterpacht A (2011) SPOC1 (PHF13) is required for spermatogonial stem cell differentiation and sustained spermatogenesis. *J Cell Sci.*, 124:3137–3148.
11. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE (2004) Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet.*, 36:647–652.
12. Bump EA, Cerce BA, al-Sarraf R, Pierce SM, Koch CJ (1992) Radioprotection of DNA in isolated nuclei by naturally occurring thiols at intermediate oxygen tension. *Radiat Res.*, 132:94–104.
13. Charles River Laboratories (2004) SCID Mouse (Severe Combined Immunodeficiency).  
[http://info.criver.com/research\\_models\\_and\\_services/research\\_models/RM\\_DS\\_SCIDMouseW.pdf](http://info.criver.com/research_models_and_services/research_models/RM_DS_SCIDMouseW.pdf), 01.08.2013, 10:30 Uhr.
14. Chen KY, Withers HR (1972) Survival characteristics of stem cells of gastric mucosa in C 3 H mice subjected to localized gamma irradiation. *Int J Radiat Biol.*, 21:521–534.
15. Chen SJ, Zelent A, Tong JH, Yu HQ, Wang ZY, Derré J, Berger R, Waxman S, Chen Z (1993) Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *Clin Invest.*, 91:2260–2267.
16. Cooke HJ, Saunders PT (2002) Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet.*, 3:790–801.
17. Cordelli E, Eleuteri P, Grollino MG, Benassi B, Blandino G, Bartoleschi C, Pardini MC, Di Caprio EV, Spanò M, Pacchierotti F, Villani P (2012) Direct and delayed X-ray-induced DNA damage in male mouse germ cells. *Environ Mol Mutagen.*, 53:429–439.
18. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP (2004) Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet.*, 36:653–659.

19. de Rooij DG (1973) Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. I. Normal situation. *Cell Tissue Kinet.*, 6:281–287.
20. de Rooij DG, Van Dissel–Emiliani FM, Van Pelt AM (1989) Regulation of spermatogonial proliferation. *Ann N Y Acad Sci.*, 564:140–153.
21. de Ruiter–Bootsma AL, Kramer MF, de Rooij DG (1977) Survival of spermatogonial stem cells in the mouse after split–dose irradiation with fission neutrons of 1–MeV mean energy or 300–kV X rays. *Radiat Res.*, 71:579–592.
22. Dym M, Fawcett DW (1970) The blood–testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod.*, 3:308–326.
23. Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S (2006) Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update.*, 12:275–282.
24. Erickson BH, Blend MJ (1976) Response of the Sertoli cell and stem germ cell to <sup>60</sup>Co gamma–radiation (dose and dose rate) in testes of immature rats. *Biol Reprod.*, 14:641–650.
25. Filipponi D, Hobbs RM, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini EA, Pandolfi PP, Dolci S (2007) Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Mol Cell Biol.*, 27:6770–6781.
26. Fogg LC, Cowing RF (1951) The changes in cell morphology and histochemistry of the testis following irradiation and their relation to other induced testicular changes. I. Quantitative random sampling of germinal cells at intervals following direct irradiation. *Cancer Res.*, 11:23–28.
27. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation–associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki–67. *J Immunol.*, 133:1710–1715.
28. Gong EJ, Shin IS, Son TG, Yang K, Heo K, Kim JS (2013) Low–dose–rate radiation exposure leads to testicular damage with decreases in DNMT1 and HDAC1 in the murine testis. *J Radiat Res.*,

29. Haines GA, Hendry JH, Daniel CP, Morris ID (2002) Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol Reprod.*, 67:854–861.
30. Hasegawa M, Zhang Y, Niibe H, Terry NH, Meistrich ML (1998) Resistance of differentiating spermatogonia to radiation-induced apoptosis and loss in p53-deficient mice. *Radiat Res.*, 149:263–270.
31. Huckins C, Oakberg EF (1978) Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. II. The irradiated testes. *Anat Rec.*, 192:529–542.
32. Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA Jr, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature.*, 432:406–411.
33. Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S (1994) Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91:6098–6102.
34. Jahnukainen K, Ehmcke J, Nurmio M, Schlatt S (2001) Irradiation causes acute and long-term spermatogonial depletion in cultured and xenotransplanted testicular tissue from juvenile nonhuman primates. *Endocrinology.*, 148:5541–5548.
35. Jeggo PA, Löbrich M (2007) DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene.*, 26:7717–7719.
36. Jeggo PA, Geuting V, Löbrich M (2011) The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiother Oncol.*, 101:7–12.
37. Joshi DS, Yick J, Murray D, Meistrich ML (1990) Stage-dependent variation in the radiosensitivity of DNA in developing male germ cells. *Radiat Res.*, 121:274–281.
38. Kasten-Pisula U, Menegakis A, Brammer I, Borgmann K, Mansour WY, Degenhardt S, Krause M, Schreiber A, Dahm-Daphi J, Petersen C, Dikomey E, Baumann M (2009) The extreme radiosensitivity of the

- squamous cell carcinoma SKX is due to a defect in double-strand break repair. *Radiother Oncol.*, 90:257–264.
39. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 53:3976–3985.
  40. Kochar NK, Harrison RG (1971) The effect of x-rays on lipids, phospholipids and cholesterol of the mouse testis. *J Reprod Fertil.*, 27:159–165.
  41. Liu G, Gong P, Bernstein LR, Bi Y, Gong S, Cai L (2007) Apoptotic cell death induced by low-dose radiation in male germ cells: hormesis and adaptation. *Crit Rev Toxicol.*, 37:587–605.
  42. Löbrich M, Jeggo PA (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer.*, 7:861–869.
  43. Lopez-Contreras AJ, Fernandez-Capetillo O (2012) Signalling DNA Damage. Chapter 8, Protein Phosphorylation in Human Health, Academic Press/InTech, ISBN 978-953-51-0737-8.
  44. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J.*, 417:639–650.
  45. Mazón G, Mimitou EP, Symington LS (2010) SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell.*, 142:646.
  46. Meistrich ML, Finch M, Lu CC, de Ruiter-Bootsma AL, de Rooij DG, Davids JA (1984) Strain differences in the response of mouse testicular stem cells to fractionated radiation. *Radiat Res.*, 97:478–487.
  47. Meistrich ML (1986) Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol Reprod.*, 34:17–28.
  48. Moynahan ME, Jasin M (2010) Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11:196–207.

49. Oakberg EF (1955) Sensitivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated in various stages of maturation in the mouse. *Radiat Res.*, 2:369–391.
50. Oakberg EF (1956) Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat.*, 99:507–516.
51. Oakberg EF (1959) Initial depletion and subsequent recovery of spermatogonia of the mouse after 20 r of gamma rays and 100, 300, and 600 r of x-rays. *Radiat Res.*, 11:700–719.
52. Oakberg EF, DiMinno RL (1960) X-ray sensitivity of primary spermatocytes of the mouse. *Int J Radiat Biol.*, 2:196–209.
53. Oakberg EF (1971) Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec.* 169:515–531.
54. Oatley JM, Brinster RL (2006) Spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol.*, 419:259–282.
55. Olive PL (1998) The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res.*, 150:S42–S51.
56. Payne C, Braun RE (2006) Histone lysine trimethylation exhibits a distinct perinuclear distribution in Plzf-expressing spermatogonia. *Dev Biol.*, 293:461–472.
57. Peng G, Lin SY (2011) Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World J Clin Oncol.*, 2:73–79.
58. Pineau C1, Velez de la Calle JF, Pinon-Lataillade G, Jégou B (1989) Assessment of testicular function after acute and chronic irradiation: further evidence for an influence of late spermatids on Sertoli cell function in the adult rat. *Endocrinology.*, 124:2720–2728.
59. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.*, 273:5858–5868.

60. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.*, 146:905–916.
61. Rothkamm K, Löbrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100:5057–5062.
62. Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.*, 23:5706–5715.
63. Rowley MJ, Leach DR, Warner GA, Heller CG (1974) Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiat Res.*, 59:665–678.
64. Rube CE, Zhang S, Miebach N, Fricke A, Rube C (2011) Protecting the heritable genome: DNA damage response mechanisms in spermatogonial stem cells. *DNA Repair (Amst.)*, 10:159–168.
65. Schanz S, Schuler N, Lorat Y, Fan L, Kaestner L, Wennemuth G, Rube C, Rube CE (2012) Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation. *DNA Repair (Amst.)*, 11:823–832.
66. Schrans-Stassen BH, van de Kant HJ, de Rooij DG, van Pelt AM (1999) Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology.*, 140:5894–5900.
67. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol.*, 151:1381–1390.
68. Shaver SL (1953) X-irradiation injury and repair in the germinal epithelium of male rats. II. Injury and repair in immature rats. *Am J Anat.*, 92:433–449.
69. Sheridan W (1971) The effects of the time interval in fractionated x-ray treatment of mouse spermatogonia. *Mutat Res.*, 13:163–169.
70. Sugiura K1, Failla G (1922) Some effects of radium radiations on white mice. *J Gen Physiol.*, 4:423–436.

71. Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7:739–50.
72. van Beek ME, Davids JA, van de Kant HJ, de Rooij DG (1984) Response to fission neutron irradiation of spermatogonial stem cells in different stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Radiat Res.*, 97:556–569.
73. van Beek ME, Davids JA, de Rooij DG (1986, a) Nonrandom distribution of mouse spermatogonial stem cells surviving fission neutron irradiation. *Radiat Res.*, 107:11–23.
74. van Beek ME, Davids JA, de Rooij DG (1986, b) Variation in the sensitivity of the mouse spermatogonial stem cell population to fission neutron irradiation during the cycle of the seminiferous epithelium. *Radiat Res.*, 108:282–295.
75. van der Meer Y, Huiskamp R, Davids JA, van der Tweel I, de Rooij DG (1992) The sensitivity of quiescent and proliferating mouse spermatogonial stem cells to X irradiation. *Radiat Res.*, 130:289–295.
76. van der Meer Y, Huiskamp R, Davids JA, de Rooij DG (1993) Differential effects of fractionated X irradiation on mouse spermatogonial stem cells. *Radiat Res.*, 135:222–228.
77. van Gent DC, van der Burg M (2007) Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene.*, 26:7731–7740.
78. van Loon AA, Sonneveld E, Hoogerbrugge J, van der Schans GP, Grootegoed JA, Lohman PH, Baan RA (1993) Induction and repair of DNA single-strand breaks and DNA base damage at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster upon in vitro exposure to ionizing radiation. *Mutat Res.*, 294:139–148.
79. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature.*, 412:607–614.
80. Withers HR (1971) Regeneration of intestinal mucosa after irradiation. *Cancer.*, 28:75–81.

81. Zhang, Shen (2010) Accumulation of DNA damage–induced chromatin alterations in tissue–specific stem cells: the driving force of aging? Dissertation Medizinische Fakultät, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.



## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 bindendes Protein 1
Abb.	Abbildung
ATM	Ataxia Teleangiektasie mutiertes Homolog
ATR	engl. <i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i> ; Ataxia Teleangiektasie und Rad3-verbundenes Protein
bzw.	beziehungsweise
C57	C57BL/6N (Mausstamm)
CSA	engl. <i>cross sectional area</i> ; Querschnittsfläche
CtBP	C-Terminus bindendes Protein 1
CtIP	CtBP-interagierendes Protein
d	engl. <i>days</i> ; Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK <sub>cs</sub>	engl. <i>catalytic subunit</i> ; katalytische Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase
Em.	Emission
engl.	englisch
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii, et aliae, et alia</i> ; und andere
Ex.	Extinktion
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	lat. <i>hora</i> , Stunde
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HR	Homologe Rekombination
MRE11	DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturprotein MRE11
MRN-Komplex	MRE11-RAD50-NBS1-Komplex
NBS1	engl. <i>Nijmegen breakage syndrome protein 1 homolog</i>
NHEJ	engl. <i>non-homologous end joining</i> ; nicht-homologe Endverknüpfung
PARP1	Poly-[ADP-Ribose]-Polymerase 1
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PIK	Phosphoinositid-3-Kinasen
PK	Proteinkinase

---

PLZF	engl. <i>promyelocytic leukemia zinc finger</i> ; promyelozytische Leukämie Zinkfinger-Protein
PTM	peritubulären Myoidzellen
RAD50	DNA-Reparaturprotein RAD50
RAD51	DNA-Reparaturprotein RAD51
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
SCF	engl. <i>stem cell factor</i> ; Stammzellfaktorprotein
SCID	engl. <i>severe combined immunodeficiency</i> ; schwerer kombinierter Immundefekt
sog.	so genannt
SSCs	spermatogonische Stammzellen
ssDNA	engl. <i>single-strand DNA</i> ; Einzelstrang-DNA
Tab.	Tabelle
XRCC4	engl. <i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
z. B.	zum Beispiel

Neben den oben stehenden Abkürzungen wurden die gängigen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

## **6.3      Abbildungsverzeichnis**

### **Einleitung**

- Abbildung 2.1      Mechanismen der DSB-Reparatur
- Abbildung 2.2      Aufbau des murinen Hodengewebes

### **Material und Methoden**

- Abbildung 3.1      Darstellung der Tubulusquerschnittsfläche

### **Ergebnisse**

- Abbildung 4.1      Bestimmung der CSA
- Abbildung 4.2      Anzahl PLZF-positiver Stammzellen pro Tubulus
- Abbildung 4.3      Anzahl Ki67-positiver Zellen pro Tubulus
- Abbildung 4.4      Anzahl PARP1-positiver Zellen pro Tubulus
- Abbildung 4.5      Quantifizierung der 53BP1-Foci in PLZF positiven  
Stammzellen
- Abbildung 4.6      Regeneration murinen Hodengewebes

## **6.4 Tabellenverzeichnis**

### **Material und Methoden**

Tabelle 3.1	Liste der verwendeten Chemikalien
Tabelle 3.2	Liste der verwendeten Primärantikörper
Tabelle 3.3	Liste der verwendeten Sekundärantikörper
Tabelle 3.4	Bestrahlungsplan zur fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung adulter Mäuse

## 7 Danksagung

Mein Dank geht an alle die direkt oder indirekt am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren.

Prof. Dr. med. Christian Rube, Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, sowie der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie der Universität des Saarlandes, Prof. Dr. med. Claudia E. Rube, möchte ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes, des Themas dieser Doktorarbeit und den Einblick in die moderne medizinische Forschung danken.

Stefanie Schanz gilt mein Dank für die Unterstützung im Labor und die gehaltvollen Diskussionen.

Jochen Greser möchte ich für seine aufbauenden Worte, die außerordentliche Unterstützung während meines Studiums bis hin zur Promotion und darüber hinaus aufrichtig danken. Danke, dass du immer für mich da bist!

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Doris Maria und Franz Rudolf und meinen Geschwistern Katharina und Stefan die mich während meines Studiums und während der Promotion stetig unterstützt haben. Danke für euren Rückhalt!

