

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik

Klinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Christian Stief

***Einfluss von Glykolsäure auf Spermien und andere
molekulare Marker in der andrologischen Diagnostik***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Susanne Nadine Bour

aus

Neuburg an der Donau

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Armin Becker
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Oliver Reich PD Dr. Robert Ochsenkühn
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Matthias Trottmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	17.11.2022

*„Über den Wolken ...“
Meinem Opa gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1. Einleitung	11
1.1. Kinderwunsch, IVF und ICSI	11
1.2. Zusammensetzung der Samenflüssigkeit und Interaktionen.....	12
1.3. Zellulärer Aufbau des Spermiums.....	13
1.3.1. Kopfreion mit Akrosom.....	14
1.3.2. Mittelstück mit Mitochondrium.....	15
1.3.3. Flagellum.....	15
1.3.4. Plasmamembran der Spermien	16
1.4. Spermogramm (WHO) allgemein	17
1.4.1. Anzahl und Konzentration der Spermien.....	18
1.4.2. Motilität	18
1.5. Glykolsäure (Hydroxyessigsäure)	19
1.6. Kalziumeinfluss auf Spermien.....	19
1.7. Sonstige Parameter.....	20
1.8. Bedeutung des Spermogramms für die natürliche und künstliche Befruchtung	20
1.9. Zelluläre Marker in der Andrologie	21
2. Fragestellung	25
3. Material und Methoden	27
3.1. Material	27
3.1.1. Ethikvotum.....	27
3.1.2. Studienpopulationen	27
3.1.3. Geräte.....	28
3.1.4. Verbrauchsmaterialien	29
3.1.5. Chemikalien.....	30
3.1.6. Pufferlösungen	32
3.1.7. Antikörper und FITC-konjugierte Zucker	34
3.2. Methoden.....	34
3.2.1. Aufbereitung der Ejakulate.....	34
3.2.2. Versuchsaufbau mit verschiedenen Puffern.....	35

3.2.3.	Anfertigung von Ausstrichen	36
3.2.4.	Fluoreszenz-Färbungen	36
3.2.5.	Proteinextraktion von Spermien.....	37
3.2.6.	SDS-PAGE und Western Blot.....	38
3.2.7.	Immunostaining Anti-CatSper Antikörper	39
3.2.8.	Kalzium Imaging und Fluoreszenz-Mikroskopie	39
3.2.9.	FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) Analysen	40
3.2.10.	Statistische Methoden.....	40
4.	Ergebnisse	42
4.1.	Allgemeine Motilitätsbestimmung humaner (n=10), boviner (n=10) und porciner (n=2) Spermien.....	42
4.2.	Spermien-Motilität mit Glykolsäure	43
4.2.1.	Human frisch (n = 10).....	43
4.2.2.	Human kryokonserviert (n = 9)	44
4.2.3.	Porcin frisch (n=1).....	47
4.3.	Versuche mit Kalzium-Kanal Blocker (CatSper1-Blocker)	48
4.3.1.	Human kryokonserviert (n=10)	48
4.3.2.	Bovin kryokonserviert (n=7).....	50
4.4.	Einfluss von verschiedenen Zuckern im Seminalplasma (human, frisch n = 2).....	52
4.5.	Nachweis der Aufnahme von Kalzium in Spermien mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (Kalzium-Imaging) n = 8	53
4.6.	Mitochondriale Aktivität mit Glykolsäure (human).....	55
4.6.1.	Auswertung mit Flowing Software	55
4.6.2.	Mitochondriale Aktivität (n=10)	55
4.7.	CatSper1-Immunhistochemie.....	56
4.8.	Zusammenhang von Samenparametern und Fertilität	57
4.9.	Färbung von Spermien mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Zuckern.....	58
4.9.1.	Oligozoospermie und Asthenozoospermie.....	59
4.9.2.	Zusammenhang mit Fertilität und Kinderwunsch	60
5.	Diskussion.....	62
5.1.	Bedeutung der Motilität von Spermien mit und ohne Kryokonservierung für die künstliche Befruchtung	62
5.2.	Bedeutung der Motilität von Spermien nach Kryokonservierung bei der Tierzucht im Vergleich zu humaner Spermienqualität.....	63
5.2.1.	Allgemeine Motilitätsbestimmung humaner, boviner und porciner Spermien... 64	
5.2.2.	Bedeutung der Motilität unter Einfluss verschiedener Agenzien.....	65

5.2.3.	Glykolsäure (Hydroxyessigsäure).....	65
5.2.4.	CatSper1-Blocker und Glykolsäure	68
5.2.5.	Verschiedene Zuckerarten im Seminalplasma	69
5.3.	Allgemeine Bedeutung von Motilität und anderen Parametern in der Andrologie ...	70
5.4.	Einfluss des Kalziums auf die Motilität von Spermien (Calcium Imaging)	72
5.5.	Mitochondriale Aktivität unter Glykolsäure-Einfluss.....	73
5.6.	CatSper-Immunhistochemie.....	74
5.7.	Bindung verschiedener Zucker auf der Oberfläche von konservierten Spermien ...	75
5.7.1.	Lokalisation und Charakterisierung	75
5.7.2.	Bedeutung der Bindung für die Bildung eines SpermienSpeichers und Einschränkungen der Zucker-Bindung bei eingeschränkter Fertilität.....	77
5.8.	Ausblick.....	79
6.	Zusammenfassung	80
	Literaturverzeichnis	82
	Anhang: Fragebogen und Einverständniserklärung zur Studie	94
	Danksagung	99
	Affidavit.....	100
	Lebenslauf.....	101
	Publikationsliste.....	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Gliederung des Spermiums	14
Abbildung 2: Aufbau der humanen Spermienplasmamembran	17
Abbildung 3: Strukturformel von Glykolsäure	19
Abbildung 4: a) Humanes Epithel der Ampulle (HE gefärbt), b) Model zur Bildung der Spermien-Eileiter Interaktion.....	23
Abbildung 5: Allgemeine Motilitätsbestimmung humaner, boviner und porciner Spermien am Beginn der Untersuchung und nach 30 Minuten	42
Abbildung 6: Motilität frischer humaner Samenproben unter dem Einfluss von 30mM und 60 mM Glykolsäure	43
Abbildung 7: Motilität kryokonservierter humaner Samenproben unter dem Einfluss von Glykolsäure.....	44
Abbildung 8: Motilität von kryokonservierten bovinen Samenproben unter dem Einfluss von Glykolsäure.....	46
Abbildung 9: Motilität von frischen porcinen Samenproben unter dem Einfluss von Glykolsäure	47
Abbildung 10: Motilität von kryokonservierten humanen Spermien unter Einfluss von CatSper-Blocker und Glykolsäure	48
Abbildung 11: Motilität von kryokonservierten bovinen Samenproben unter dem Einfluss von CatSper-Blocker und Glykolsäure	50
Abbildung 12: Einfluss verschiedener Zucker im Seminalplasma von humanen Samenproben auf die Motilität	52
Abbildung 13: Calcium-Imaging und lichtmikroskopische Aufnahme), (*) Spermium ohne Calcium-Aufnahme, (#) Spermium mit Calcium-Aufnahme	53
Abbildung 14: Anteil an Spermien mit aktivem Calcium-Einstrom nach Markierung mit Fluo4AM und Fluoreszenz-Intensität der Samenproben in Abhängigkeit von CatSper-Blocker und Glykolsäure.....	54
Abbildung 15: FACS-Auswertung mit Dotplot der Spermien und JC-1 red Fluoreszenz	55
Abbildung 16: Mitochondriale Aktivität von humanen Samenproben unter Einfluss von Glykolsäure.....	56
Abbildung 17: Westernblot-Membran mit ESBL markiert. Anti-CatSper1-Antikörper 1:5000, CatSper1 human (*)	56
Abbildung 18: Vergleich verschiedener Parameter der Spermioogramme von Kinderwunsch-Patienten und Patienten mit eigenen Kindern	57
Abbildung 19: Zuckerbindung von humanen Spermien. Konfokale Laser Mikroskopie 400x	58

Abbildung 20: Vergleich der Zuckerbindung humaner Spermien in Abhängigkeit pathologischer Spermioogramm-Parameter.....	59
Abbildung 21: Anzahl gebundener Zucker bei humanen Spermien in Abhängigkeit von Fertilität und Kinderwunsch.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des humanen Seminalplasmas	12
Tabelle 2: Einteilung der Motilität nach WHO-Kriterien	18
Tabelle 3: Versuchsreihen mit humanen Spermien	35
Tabelle 4: Versuchsreihen mit bovinen Ejakulaten	36
Tabelle 5: Versuchsreihen mit porcinen Ejakulaten	36
Tabelle 6: Färbelösung für Spermien-Ausstriche	37
Tabelle 7: Reagenz-Zusammensetzung für die Auftragung auf SDS-Gel.....	38
Tabelle 8: Versuchsaufbau Kalzium-Imaging von human Spermien	40
Tabelle 9: Statische Auswertung Motilität frischer humaner Samenproben	43
Tabelle 10: Statische Auswertung der Motilität kryokonservierter humaner Samenproben...	45
Tabelle 11: Statistische Auswertung der Motilität kryokonservierter boviner Samenproben .	46
Tabelle 12: Statistische Auswertung der Motilität kryokonservierter humaner Samenproben mit Kalzium-Kanal-Blocker und Glykolsäure	49
Tabelle 13: Statistische Auswertung der Motilität kryokonservierter boviner Samenproben mit Calcium-Kanal-Blocker und Glykolsäure	51
Tabelle 14: Statistische Auswertung der Zuckerbindung in Abhängigkeit von Samenparametern.....	59
Tabelle 15: Statistische Auswertung der Zuckerbindung in Abhängigkeit von Kinderwunsch	61

Abkürzungsverzeichnis

<i>ART</i>	Assistierte Reproduktionstechnik
<i>IVF</i>	In-vitro-Fertilisation
<i>ICSI</i>	Intrazytoplasmatische Spermien-Injektion
<i>PID</i>	Präimplantationsdiagnostik
<i>DNS</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>mtDNS</i>	Mitochondriale Desoxyribonucleinsäure
<i>CatSper</i>	Cation-Channel of Sperm (Kationen-Kanal von Spermien)
<i>WHO</i>	World Health Organization
<i>ACE</i>	Angiotensin Converting Enzyme
<i>DAPI</i>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<i>PBS</i>	Phosphate buffered Saline
<i>FITC</i>	Fluoresceinisothiocyanat
<i>BSA</i>	Bovine serum albumin
<i>GA</i>	Glycolic acid (Glykolsäure)
<i>kDa</i>	Kilo-Dalton
<i>OAT</i>	Oligo-Asthenio-Teratozoospermie

1. Einleitung

1.1. Kinderwunsch, IVF und ICSI

Infertilität wird beschrieben als das Unvermögen, eine Schwangerschaft nach einem Jahr ungeschütztem Geschlechtsverkehr herbeizuführen. In der heutigen Zeit wird vermutet dass ca. 15% der Paare mit Kinderwunsch ungewollt kinderlos bleiben (Palermo u. a. 2014). Bei Kinderlosigkeit sind 50 % der Fälle mit männlichen Fertilitätsproblemen assoziiert (Palermo u. a. 2017). Diese werden durch die klinischen Bilder von Oligozoospermie (Anzahl der Spermien zu gering), Asthenozoospermie (Beweglichkeit der Spermien ist eingeschränkt), Teratozoospermie (Morphologie der Spermien ist pathologisch) oder einer Kombination dieser Krankheitsbilder verursacht. Oftmals kann die männliche Infertilität auch durch das völlige Fehlen von Spermatozoen (Azoospermie) verursacht sein.

Die Prognose, eine erfolgreiche Schwangerschaft mit diesen Einschränkungen der Samenqualität herbeizuführen, kann selbst mit assistierten Reproduktionstechniken (ART) gering sein (Palermo u. a. 2017). In den letzten vier Jahrzehnten wurden diese Techniken zunehmend verbessert und die In-vitro-Fertilisation (IVF) wurde nach und durch die Intra-zytoplasmatischen-Spermatozoen-Injektion (ICSI) ergänzt (Palermo u. a. 1992). Diese Technik erlaubt es, Spermien unabhängig von ihrer Motilität oder anderen einschränkenden Faktoren in eine Eizelle einzubringen und so eine Befruchtung herbeizuführen. Somit wurden die Minimalanforderungen an die Spermienqualität zur Durchführung einer erfolgreichen ART deutlich reduziert. Die ICSI Methode hat heute mit bis zu 80 % Einsatz bei künstlichen Befruchtungen (Palermo u. a. 2009) die IVF zunehmend abgelöst. Ein Grund hierfür könnte unter anderem die Möglichkeit der genetischen Präimplantationsdiagnostik (PID) sein, die nur unter strengen Auflagen in Deutschland erlaubt ist. In den USA werden heute viele ICSIs durchgeführt, auch wenn kein medizinischer Grund hierfür besteht und eine IVF genauso erfolgversprechend gewesen wäre (Simopoulou u. a. 2016). Diese Entwicklung sollte jedoch auch kritisch gesehen werden, da ein pekuniäres Interesse bei ICSI-Behandlungen vorliegen kann und es auch nicht abschließend geklärt ist, ob Männer mit Oligozoospermie nicht doch ein höheres Risiko aufweisen, bei Befruchtung einen mit unbalancierten genetischen Aberrationen behafteten Embryo zu zeugen (Stegen u. a. 2012). Auch wenn eine ICSI zunehmend in den Kinderwunschkliniken zum Einsatz kommt, eine höhere Schwangerschaftsrate als bei IVF-Behandlungen konnte damit bis heute nicht erreicht werden (Simopoulou u. a. 2016). Dennoch stellt die ICSI für Männer mit Fertilitätsproblemen, wie kinetische Defekte der Spermien oder akrosomale Dysfunktion (Palermo u. a. 1996) oft die einzige Möglichkeit dar, eigene Kinder zu bekommen. Bis 2012 wurden weltweit über zwei Millionen Kinder mithilfe von ICSI geboren (ESHRE 2012, Sullivan u. a. 2013).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

1.2. Zusammensetzung der Samenflüssigkeit und Interaktionen

Die Samenflüssigkeit bzw. Ejakulat des Mannes besteht aus dem zellulären Teil - den Spermien - und dem Seminalplasma. Auf den zellulären Teil wird in den folgenden Kapiteln (siehe 1.3.ff) näher eingegangen. Das Seminalplasma wird zu 50 bis 70 % aus dem Sekret der Samenbläschen gebildet, welches Fructose zum Energiegewinn der Spermien enthält. Einen Überblick über die Zusammensetzung der Samenflüssigkeit gibt Tabelle 1. Das Seminalplasma enthält auch Lipide, Peptide, Proteine, Zytokine und Chemokine, welche von Testis, Epididymis und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebildet werden (Remes, Lenicov u. a. 2014). Unter den Proteinen befinden sich auch zahlreiche Aminopeptidasen, Glykosidasen, Hyaluronidasen, Muzine und viele andere (Duncan und Thompson 2007). Weitere Bestandteile sind größere Mengen an Prostaglandinen der E-Familie, TGF- β (Sharkey u. a. 2012; Templeton u.a. 1978) und Fibrinogen sowie das Protein Semenoglein, welches dem Ejakulat eine geschmeidige Konsistenz verleiht. Prostaglandine und TGF- β sorgen dafür, dass eine massive Immunreaktion im weiblichen Genitaltrakt bei Insemination des Ejakulates stattfindet. Diese geht einher mit einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Dendritischen Zellen im weiblichen Genitaltrakt nach dem Geschlechtsverkehr (Remes Lenicov u. a. 2014). Durch die inflammatorischen Zytokine wird der Uterus auf die Implantation eines Fetus vorbereitet (Chaouat 2013) und die lokale Rekrutierung von Effektoren des angeborenen Immunsystems schützt vor Infektion mit sexuell übertragbaren Krankheitserregern (Remes, Lenicov u. a. 2014).

Viele der Proteine, die im Seminalplasma von Menschen nachgewiesen wurden sind heute gut charakterisiert, wie die saure Phosphatase oder das PSA – prostataspezifisches Antigen (Rodriguez-Martinez 2007). Doch nur wenige werden mit der männlichen Infertilität in Verbindung gebracht.

<i>pH-Wert</i>	7-8 (leicht alkalischer Puffer)
<i>Samenblasensekret ca. 75 %</i>	Alkalisches Fructose-reiches Sekret (1,5-6,5mg/ml Fructose), Phosphorylcholin, Ascorbinsäure
<i>Prostatasekret ca. 20 %</i>	Biogene Amine (Spermidin, Spermin), Zitronensäure, Cholesterin, Phospholipide, Proteasen zur Verflüssigung des Ejakulats (Fibrinolysin, Fibrinogenase)
<i>Weitere Bestandteile</i>	Phosphat und Bikarbonat als Puffer, Prostaglandine, Hyaluronidase, Zelldetritus aus Sertolizellen, Zellen aus Vorstufen der Spermiogenese, Lymphozyten.

Tabelle 1: Zusammensetzung des humanen Seminalplasmas (nach embryology.ch der Universitäten Fribourg, Lausanne und Bern, Schweiz)

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Die Aufgaben des Seminalplasmas sind zahlreich. Die Zusammensetzung bewirkt unter anderem das Bereitstellen von Nährstoffen für die Spermien, deren Aktivierung und Verstärkung der Motilität sowie die Anlagerung von Kapazitations-Inhibitoren. Zu den Aufgaben gehört auch die Schaffung eines alkalisch gepufferten Milieus in der Scheide und die Koagulation des Ejakulats. Dieses verflüssigt sich nach 15 bis 20 min.

1.3. Zellulärer Aufbau des Spermiums

Den zellulären Teil des Ejakulates machen die Spermien oder Spermatozoen aus. Diese haben vorrangig die Aufgabe, die DNS (Desoxyribonucleinsäure) im weiblichen Genitaltrakt zur Oozyte zu transportieren und dort die Kernfusion einzuleiten.

Der Prozess, welcher zur Reifung der Spermatozoen führt, heißt Spermatogenese. Das humane Spermium ist die Zelle, die mit am weitesten differenziert ist, wenn sie den Körper verlässt, um die weibliche Eizelle zu befruchten. Die Spermien sind dann morphologisch komplett jedoch funktionell unreif und unfähig eine Eizelle zu befruchten. (Freitas u. a. 2017) Um die Funktionalität zu erhalten müssen die männlichen Keimzellen verschiedene Prozesse durchlaufen. Diese sind die Reifung im Nebenhoden, die Kapazitation und die Akrosom-Reaktion, welche erst im weiblichen Reproduktionstrakt stattfindet (Abou-haila und Tulsiani 2009). Diese Prozesse bedingen sich gegenseitig und sind aufeinander aufgebaut.

Die Spermatozoen sind aus drei Teilen aufgebaut: dem Kopfteil, der die DNS enthält, dem Mittelstück mit Mitochondrium und dem Schwanz (auch Flagellum), der für das Vorankommen des Spermiums sorgt. Ein humanes Spermium weist eine Länge zwischen 60 und 70 μm auf. Auf den molekularen Aufbau der einzelnen Teile, sowie der Plasmamembran wird im Folgenden detailliert eingegangen.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

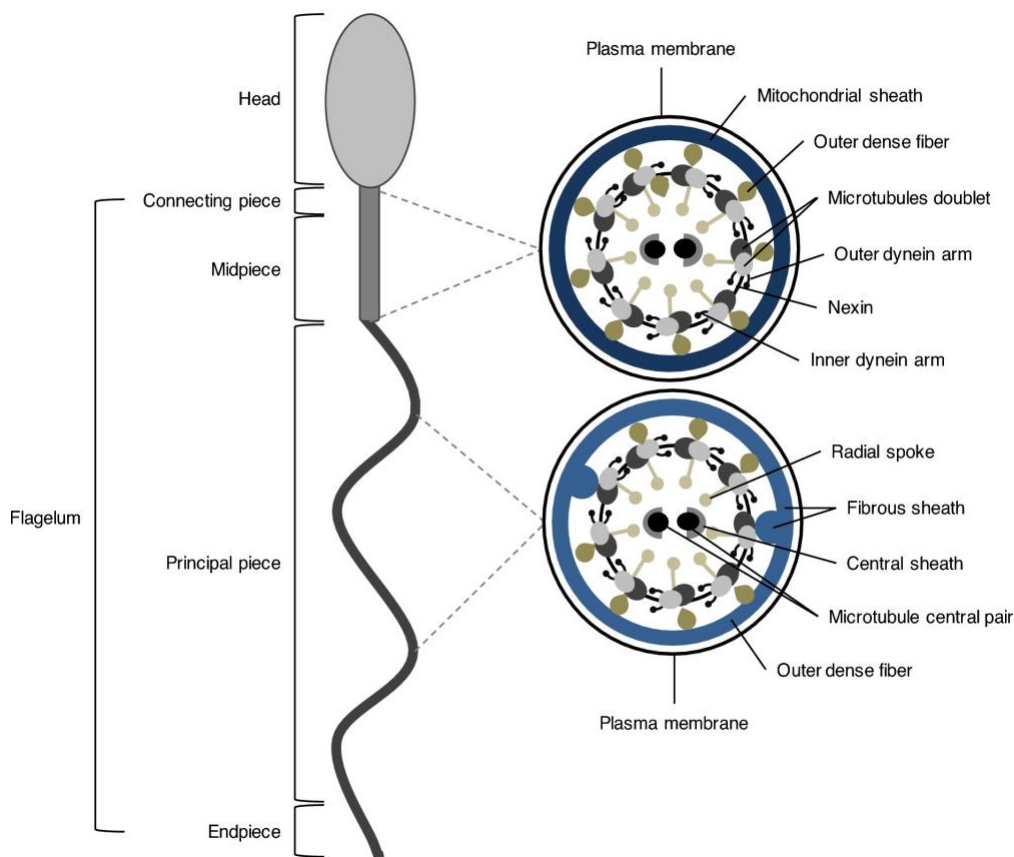


Abbildung 1: Aufbau und Gliederung des Spermiums nach (Freitas, Vijayaraghavan, und Fardilha 2017)

1.3.1. Kopfregion mit Akrosom

Dem „Kopfteil“ des Spermiums kommt die größte Bedeutung in der Fortpflanzung zu und misst ca. 3 bis 5 μm in der Länge. Er enthält die DNS – das Erbgut – des Mannes in einem haploiden Chromosomensatz. Das Chromatin ist dicht gepackt wegen des Austausches von Histaminen durch Protamine. Dies führt unter anderem auch zu einem sehr guten Schutz vor DNS Schäden (Barratt u. a. 2010). Die Form des Kopfes steht in direktem Zusammenhang mit der genetischen Ausstattung und ist in den meisten Spezies hochkonserviert (Mortimer 2018). Es ist ungewöhnlich, dass die humanen Spermatozoen eine höchst variable Morphologie des Kopfes aufweisen. Diese wurde auf weniger Konkurrenzdruck im Laufe der Evolution zurückgeführt (van der Horst und Maree 2014), bzw. könnte auf Inzucht zurückzuführen sein (Roldan u. a. 1998).

Der vordere Teil des Spermienkopfes wird vom Akrosom eingenommen, dem einzigen Organell welches spezifisch für Spermien ist. Dieses besteht aus der Akrosom-Vakuole und subakrosomalem Material (Aktin-Filamente). Die Vakuole enthält lytische Enzyme, welche die Zona pellucida der Oozyte auflösen und so bei der Durchdringung der Eihülle im Rahmen der

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Befruchtung helfen. Das subakrosomale Material schiebt die innere Akrosom-Membran auf das Oolemma zu und leitet so die Verschmelzung der beiden Zellplasmen ein.

1.3.2. Mittelstück mit Mitochondrium

Die mittlere Region des Flagellums misst in der Regel 5 bis 7 μm und besteht aus den verbindenden Strukturen zur Halsregion und dem anterioren Teil des Schwanzes. In dieser Region ist das axiale Filament des Flagellums von einer Doppelhelix aus Mitochondrien umgeben (Mortimer 2018). Das typische Säugetier-Spermium enthält zwischen 50 und 75 Mitochondrien mit je einer mtDNA Kopie (Ankel-Simons und Cummins 1996). Diese liefern die Energie, um das Flagellum am Ende zu bewegen. Die Energie die hierfür notwendig ist, wird durch ATP vermittelt und treibt axonemal Dynein ATPasen im Flagellum an (Piomboni u. a. 2012). Spermatozoen verbrauchen eine große Menge ATP um sich fort zu bewegen, deshalb ist es unerlässlich, den ATP Spiegel in der Zelle konstant aufrecht zu erhalten (Piomboni u. a. 2012). Es wird diskutiert, ob die metabolischen Stoffwechselwege für die Motilität der Spermien auf oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien oder auf Glykolyse im Flagellum und Kopf zurückzuführen sind. Eine Kombination aus beiden Wegen wäre ebenso denkbar (Freitas u. a. 2017; Piomboni u. a. 2012).

Da das Mittelstück mit den Mitochondrien am anterioren Ende des Flagellums lokalisiert ist, muss der Transport von ATP über die gesamte Länge gewährleistet sein. Zusätzlich muss auch die mitochondriale Aktivität mit steigender Motilität zunehmen (Ferramosca u. a. 2012). Ausführlich wurde diskutiert, ob die mitochondriale DNA aus dem Spermium mit in die Oozyte eindringt und ob diese mitvererbt wird. Mittlerweile ist bekannt, dass die mtDNA zwar in die Oozyte eindringt, dort aber von einem Ubiquitin-Proteasom Apparat abgebaut wird. Diese Ubiquitylierung von Spermien Mitochondrien wurde als erstes in Säugetier-Spermien entdeckt (Peter Sutovsky und Song 2017).

1.3.3. Flagellum

Das Flagellum enthält den motilen Apparat, welcher das Spermium dazu befähigt, sich fortzubewegen. Es wird grundsätzlich in vier Strukturen eingeteilt, wobei in der deutschen Literatur das Mittelstück als eigene Struktur angesehen wird. In der englischsprachigen Literatur besteht das Flagellum aus Verbindungsstück zum Kopf, Mittelstück mit Mitochondrien, Hauptteil des Schwanzes und Endstück (Turner 2006).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Das Haupt- und Endstück des Flagellums sorgt dafür, dass die Spermatozoen sich Moleküle als Trigger benötigt. In diesem Teil des Spermiums befinden sich die meisten Ionen-Kanäle, darunter Ca^{2+} -Ionenkanäle wie die Ca^{2+} -ATPase und der Ca^{2+} -Ionenkanal CatSper (bestehend aus vier Untereinheiten), auf welchen in den folgenden Kapiteln (5.2.3. und 5.4.) noch näher eingegangen wird. Es wird vermutet, dass dieser Kanal sowohl an der Motilität als auch am Kapazitations-Prozess beteiligt ist (Olson u. a. 2010)

1.3.4. Plasmamembran der Spermien

Die Zellen von Wirbeltieren, besonders die der Menschen haben ein einzigartiges Zuckermuster (Glykokalix), welches sie strukturell von denen der Wirbellosen unterscheidet. (Suarez und Pacey 2006) Der Aufbau der humanen Spermienplasmamembran wurde in der Vergangenheit gut untersucht. Beim Verständnis des molekularen Aufbaus, sowie dessen Funktion besteht allerdings noch Klärungsbedarf. Es gibt sehr viele unterschiedliche humane Proteine, denen Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Glykanen zugesprochen werden. Diese beinhalten noch nicht die Glykosyltransferasen, welche als humane Lektine oder Lektin-ähnliche Proteine angesehen werden. (Eddy u. a. 2003) Die Strukturen der Glykane auf menschlichen Spermien sind komplizierter aufgebaut als die vieler anderer Spezies. Als endogene Proteine weisen die humanen Lektine eine höhere Spezifität und stärkere adhärenente Kräfte zu Glykoproteinen auf (Freitas u. a. 2017).

Die Glykane erfüllen spezifische Aufgaben, wie zum Beispiel CD59, welches die Spermatozoen vor Komplement-vermitteltem Schaden schützt und das Verkleben der Gameten beim Transport durch den weiblichen Genitaltrakt verhindert. Eine reife Glykokalix erlaubt es den Spermien zudem, den zervikalen Schleim in Spezies mit vaginaler Insemination zu überwinden (Tollner u. a. 2008). Die von Zuckern überzogene Plasmamembran kann das Spermium vor humoraler oder zellulärer Immunantwort des weiblichen Genitaltrakts schützen. Zudem spielt das Muster der Glykosylierung eine große Rolle in der Spermien-Oozyten Interaktion (Ferramosca u. a. 2012).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

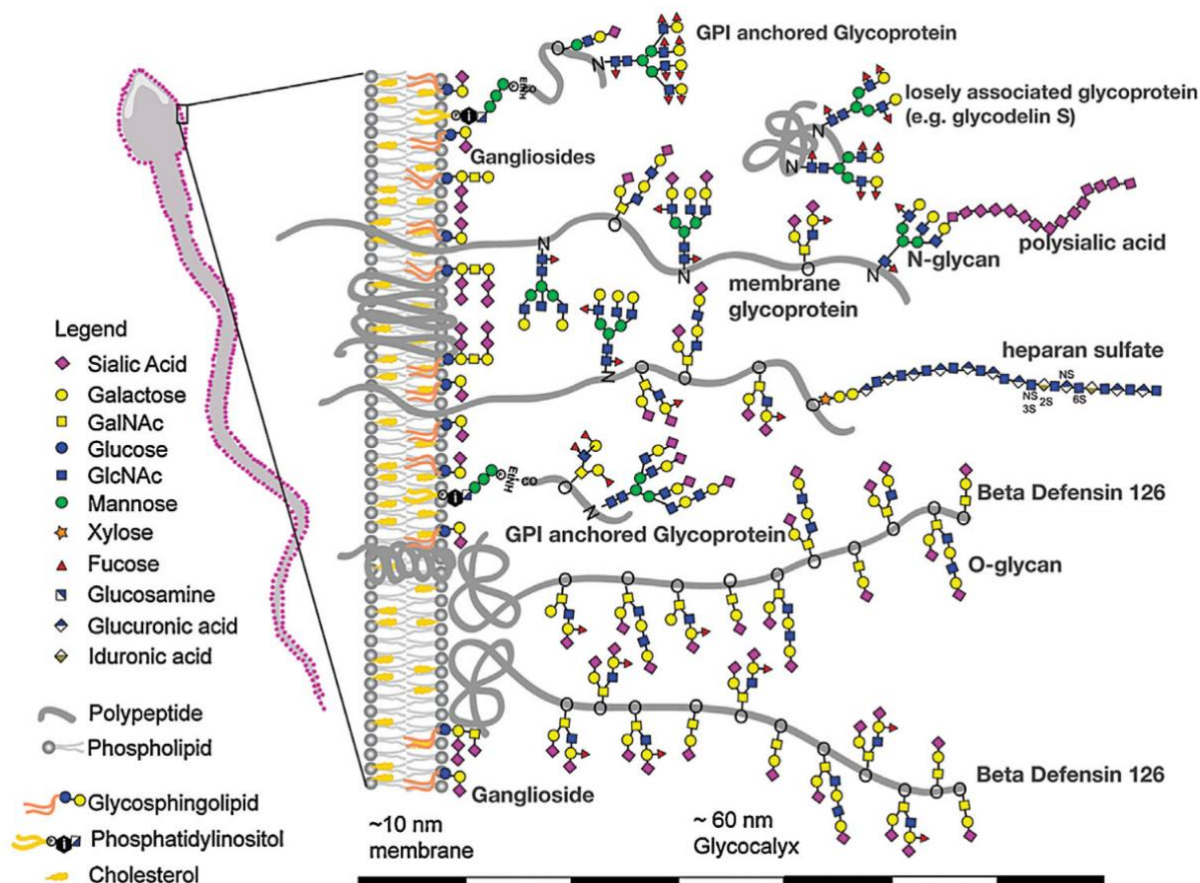


Abbildung 2: Aufbau der humanen Spermienplasmamembran (Teclé und Gagneux, 2015)

Eine reife Glykokalix erlaubt es den Spermien, den zervikalen Schleim in Spezies mit vaginaler Insemination zu überwinden (Tollner u. a. 2008). Diese beinhaltet sowohl weibliche Antikörper, Faktoren des Komplementsystems, sowie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, welche gegen die Spermatozoen oder Bestandteile davon gerichtet sind (Thompson u. a. 1992).

1.4. Spermogramm (WHO) allgemein

In den letzten Jahrzehnten wurde immer mehr die Meinung vertreten, dass der Begriff „normal“ von den Worten „idealerweise“ oder „typisch“ abgelöst werden sollte (Mortimer 2018). Die natürliche Anzahl von ideal geformten Spermien – die im Menschen eh schon sehr gering ist – sollte durch mehr Information genauer charakterisiert werden, um ihre biologische Funktionalität besser beurteilen zu können.

In Säugetieren gelangen Millionen von Spermatozoen in den weiblichen Genitaltrakt. Von dieser Menge gelangt nur ein sehr kleiner Teil (einige Dutzend) an den Ort der Oozyte zur

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Befruchtung. (Tollner u. a. 2008) Diese Interaktion verlangt jedoch, dass die Spermatozoen einige Membranumgestaltungen (Kapazitation) und zahlreiche intrazelluläre Veränderungen durchmachten (Hypermotilität u.a.). (Suarez und Pacey 2006) Im letzten Jahr wurde von der WHO eine neue überarbeitete Edition herausgegeben, welche die Kriterien für die Untersuchung von Sperma neu definiert hat. Als vielversprechend werden auch andere molekulare Parameter wie die Untersuchung von Kalzium-Kanälen bei Männern mit Normozoospermie angesehen. Diese Untersuchungen können dazu beitragen, bei ungewollt kinderlosen Paaren mit ansonsten normalen Spermioogramm-Parametern und bei Fertilität der Frau mithilfe von ART den Leidensweg erheblich zu minimieren. (Kliesch 2021)

1.4.1. Anzahl und Konzentration der Spermien

Laut WHO (2010, 2021) entsprechen 15 (16) mio Spermien/ml Ejakulat und 39 mio Spermien gesamt pro Ejakulat dem Normwert. Diese Zahlen spiegeln jedoch nicht allein die Fertilitätseigenschaften des Ejakulats wider. Bei der Auswertung von 54 wissenschaftlichen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Spermienzahl bei europäischen Männern in den letzten 50 Jahren um durchschnittlich 32 % gesunken ist (Sengupta u. a. 2018). Diese Zahlen lassen offen, ob die Fertilität sich in gleichem Masse verändert hat.

1.4.2. Motilität

Die Motilität beschreibt die Beweglichkeit der Spermatozoen. Diese werden nach WHO in verschiedene Gruppen eingeteilt.

<i>Neue Kategorien</i>	<i>Alte Kategorie</i>	<i>Motilität</i>	<i>Befund</i>
PR = progressiv	A	schnell progressiv	Gerichtete Motilität: Schnelle Vorwärtsbewegungen
	B	progressiv	Gerichtete Motilität: Nur langsame, träge Vorwärtsbewegungen
NP = Nicht- progressiv	C	nicht progressiv	Ungerichtete Motilität: Nur lokal beweglich, Kreisbewegungen
IM = Immotilität	D	immotil	Keine Beweglichkeit

Tabelle 2: Einteilung der Motilität nach WHO-Kriterien

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Um als fertil zu gelten, sollten die Spermien im Ejakulat mehr als 40 % bewegliche Spermien (PR + NP) in einem Sichtfeld beinhalten. Zudem sollten von diesen mehr als 32 % 'progressiv beweglich in einem Sichtfeld sein (PR). Zählungen können hier von Hand mit dem Lichtmikroskop oder mit einer computer-gestützten optischen Zählsoftware erfolgen.

1.5. Glykolsäure (Hydroxyessigsäure)

Die Glykolsäure ist eine organische Säure und kommt in unreifen Weintrauben, Zuckerrohrsaft, Zuckerrüben, Blättern des wilden Weins und Rosmarin vor. Aufgrund des natürlichen Vorkommens wird sie zu den Fruchtsäuren gezählt. Sie ist die einfachste α -Hydroxycarbonsäure mit der Formel $\text{HOCH}_2\text{-COOH}$.

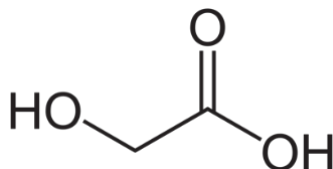


Abbildung 3: Strukturformel von Glykolsäure

Die Säure findet Verwendung in der Industrie als 20 %ige Lösung zur Entrostung durch Chelatisierung von Kalzium- und Eisenionen. Auch bei der Synthese und als Ausgangsprodukt für verschiedene Ester wird Glykolsäure verwendet. In der Medizin wird die Glykolsäure als Zusatz zu Hautcremes unter anderem mit Peeling-Funktion zur Verbesserung des Hautbildes und zur Behandlung von Akne (Valle-González u. a. 2020) verwendet.

1.6. Kalziumeinfluss auf Spermien

Im Folgenden soll auf den Kalzium-Haushalt des Spermiums eingegangen werden, da dieser für das Verständnis der vorliegenden Arbeit von Bedeutung ist. Im Spermium spielen Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) eine wichtige Rolle u. a. für die Fertilisation, die Motilität, die Chemotaxis und die Akrosom-Reaktion (Freitas u. a. 2017). Die Kalzium Kaskade in den menschlichen Zellen ist hierbei durch verschiedene Kalzium-abhängige Enzyme, intrazelluläre Kalzium-Speicher und Kalzium-Kanäle charakterisiert (Publicover u. a. 2008) und die Spermatozoen bilden hier keine Ausnahme. Weiter ist die Hemmung der Ca^{2+} Signalkaskade mit einer eingeschränkten männlichen Fertilität assoziiert (Espino u. a. 2009).

In humanen Spermatozoen wird das basale Kalzium bei einer Konzentration von 100 – 200 nM gehalten, während es im extrazellulären Medium, dem Seminalplasma, eine Konzentration

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

von etwa 1 bis 2 mM hat. Die niedrige Kalzium-Konzentration im Nebenhoden und im Vas deferens hält das Spermium in einem gewissen „steady state“ Zustand (Freitas u. a. 2017). Diese Konzentration wird grundlegend von der Ca^{2+} -ATPase aufrechterhalten, welche den größten Einfluss auf die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration hat (Dorval u. a. 2002). Im weiblichen Genitaltrakt erhöht sich die Kalzium-Konzentration massiv, um die Hypermotilität zu gewährleisten. Der Kalzium-Einstrom wird dort von verschiedenen Mediatoren reguliert und ist unter anderem durch den menstruellen Zyklus kontrolliert (Freitas u.a. 2017).

Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen - um die Hypermotilität aufrecht zu erhalten - wird zum großen Teil durch den CatSper-Kanal vermittelt, welcher am Hauptstück des Flagellums lokalisiert ist und konstitutiv bei Spannungsänderungen oder pH-Abfall eröffnet wird (Ren u. a. 2001). Der humane CatSper-Kanal wird unter anderem auch durch extrazelluläres Progesteron und Prostaglandine aktiviert (Lishko u. a. 2011).

1.7. Sonstige Parameter

Bei der Untersuchung des Ejakulats werden außerdem einige andere Parameter bestimmt, um die Fertilität abschätzen zu können. Hierzu gehört unter anderem auch die Vitalität der Spermien, die Morphologie und weitere Parameter, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

1.8. Bedeutung des Spermioграмms für die natürliche und künstliche Befruchtung

Für die natürliche Befruchtung wurden die genannten Parameter für die Beurteilung eines Ejakulats herangezogen. Doch immer wieder kommt es vor, dass die offensichtlichen Marker wohl keine ausreichende Information geben, ob Spermien im Ejakulat wirklich fähig sind, eine Eizelle zu befruchten. Hierzu müsste für die Zukunft das Wissen um die molekulare Struktur von Spermatozoen genutzt werden, um neue Reproduktionstechniken zu unterstützen und neue diagnostische Marker einzuführen. Neue Techniken, die zur Abklärung der Fertilität von Spermien etabliert werden, sollten zusätzlich die Indikation zur Durchführung einer ICSI präzisieren (Palermo u. a. 2017). Besteht eine ICSI-Indikation, stellt sich die Frage, wie ein potenziell befruchtungsfähiges Spermium ohne molekulare Marker zu selektionieren wäre? Das wichtigste Werkzeug neben den offensichtlichen Kriterien wie Vitalität, Motilität und Morphologie sollten die Überprüfung der Integrität der DNS und anderer Eigenschaften sein (Simopoulou u. a. 2016).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

1.9. Zelluläre Marker in der Andrologie

Spermatozoen werden in der modernen Labor-Diagnostik mit verschiedenen Markern versehen, um die Qualität des Ejakulats besser differenzieren zu können. Diese Techniken können schon makroskopisch Aufschluss über die Qualität des Ejakulates geben. Unter anderem können diese Marker auch mit dem Lichtmikroskop oder mit dem Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskop detektiert und gemessen werden, um Aussagen über Struktur und Funktionalität eines Spermiums zu geben.

1.9.1. Methoden zur Markierung von Spermien

Aktuelle Methoden, welche beschädigte Spermatozoen identifizieren, basieren auf organischen Fluorophoren, welche an zahlreiche Zelloberflächen oder im Zellinneren gelegene Strukturen binden (Bussalleu u. a. 2005). Diese werden zur Beurteilung der DNS - Fragmentierung oder Apoptose (Annexin-V, Sperm chromatin structure assay SCSA) herangezogen. Zudem kann die Plasmamembranintegrität durch Lebend-Tot-Zellmarkierung (SYBR14/Propidiumiodid) nachgewiesen werden. Die Akrosom-Reaktion wird durch Fluorescein-konjugiertes Pisum sativum agglutinin (PSA) oder Erdnuss Agglutinin (PNA) beurteilt. Auch für den Nachweis mitochondrialer Aktivität existiert mittlerweile ein Fluoreszenz-Farbstoff, der aktives mitochondriales Membranpotenzial detektieren kann (JC-1). Protokolle für die genannten Stoffe sind schon seit mehr als einem Jahrzehnt etabliert und werden in der Grundlagenforschung weitreichend eingesetzt (Feugang 2017).

Die genannten Agenzien sind ausgereifte Methoden, um Spermatozoen durch die Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie oder das Durchflusszytometer zu untersuchen. Allerdings stehen die aufwändige Aufbereitung und die Kosten hierfür momentan noch gegen den Mehrwert an Informationen, der zu einer höheren Befruchtungsrate führen sollte. Dies gilt sowohl in der humanen Reproduktionsmedizin als auch in der Tierzucht (P. Sutovsky 2015). Viele der aktuell verwendeten Methoden, welche Spermien markieren, führen zu deren Zerstörung bzw. haben teratogene bzw. mutagene Eigenschaften und sind hierdurch nicht für *in vivo* Techniken zur Reproduktion geeignet (Feugang 2017).

Ein alternativer Ansatz, der in der Grundlagenforschung zunehmend an Bedeutung gewinnt, sind fluoreszierende und/oder magnetische Nanopartikel, die eine nicht-zerstörende Lebendzell-Markierung ermöglichen. Mesopopöse Nanopartikel können für das Spermien-Imaging sehr gut eingesetzt werden, da sie mit den meisten gängigen Stoffen konjugierbar sind (Barkalina u. a. 2014). Andere Nanopartikel, wie Semiconductor quantum dots (Qdots) repräsentieren robuste physikalische Eigenschaften wie Photostabilität und weites Fluoreszenz-Emissionsspektrum, welches sie zu idealen Bindungspartnern für *in vitro* und *in vivo* Imaging macht (Medintz u. a. 2005). Zudem verhindert die negative Ladung unspezifische

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Bindungen mit anderen Zellmembranen während der Lebezell-Bildgebung und kann durch die Konjugation nach dem Schlüssel-Schlossprinzip mit biologischen Agenzien wie Antikörpern gekoppelt werden (Xiao u. a. 2010).

1.10. Bildung eines Spermienreservoirs

In Säugetieren werden die Spermien in einem Spermienreservoir bis zum Zeitpunkt der Ovulation gebunden. Dieses Reservoir wird durch die Bindung der Spermatozoen an die Epitheloberfläche der Eileiter vermittelt (Suarez 2008). Bei Bullen konnte gezeigt werden, dass bovine Spermien mit ihrem Kopf an Zilien-tragende Zellen des Epithels der Tuben binden (Kölle 2015). Diese Art der Bindung konnte auch in Mäusen, Schweinen und Pferden gezeigt werden (Ellington u. a. 1993; Suarez 2002; Wagner u. a. 2002). Die Spermien bleiben während der Bindung motil, das Flagellum bleibt in Bewegung. Spermien mit einer eingeschränkten Beweglichkeit des Flagellums werden dagegen als eingeschränkt befruchtungsfähig angesehen (Kölle u. a. 2009; S. Kölle u. a. 2010).

Sobald das Spermium an der Oberfläche des Eileiters gebunden hat, wird eine Signalkaskade aktiviert, die zu einer Sekretion von vielen verschiedenen Signalmolekülen führt (Yeste u. a. 2014). Als Folge verändert sich in Anwesenheit von Spermatozoen die Genexpression der sekretierenden Zellen und die Zusammensetzung der Eileiterflüssigkeit. *In vitro* binden diese sowohl an spezifische Regionen des Isthmus als auch an Regionen der Ampulle der Eileiter. Im Menschen wird vor allem der Isthmus als Ort der Bildung des Spermienreservoirs angenommen. Dies wird dadurch begründet, dass lebende Spermien hier als erstes eintreffen (Suarez und Pacey 2006). Die Anzahl der Spermien, welche an das Epithel binden ist bei nativem Sperma signifikant höher, im Vergleich zu vorher kryokonservierten Spermatozoen und die Intensität der Bindung variiert sowohl zwischen den unterschiedlichen Spezies, als auch in mehreren Ejakulaten des gleichen Individuums stark (Kölle u. a. 2010). Spermien bleiben so lange fertil, wie sie an die Ampullen-Region oder an die Isthmus-Region des Eileiters gebunden sind (Suarez und Pacey 2006). Die Zugabe von Agenzien *in vitro*, die diese Gegebenheiten imitieren und die Co-Inkubation von Spermien und Eileiter-Epithelium *in vitro* hält die Spermien länger befruchtungsfähig (Kervancioglu u. a. 1994). Allerdings wird die Bildung des Spermienreservoirs als unerlässlich für eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle angesehen. Hierfür sprechen, dass die Schwangerschaftsrate nach Geschlechtsverkehr bis zu 5 Tage vor Ovulation und einige Stunden danach am höchsten ist (Manders u. a. 2015).

Die zeitlich begrenzte Adhäsion der Spermien am Epithel des Eileiter soll diese nicht an der Bewegung hindern, sondern ihr Vorankommen im Eileiter verlangsamen bis die Eizelle gesprungen ist (Suarez und Pacey 2006). Dieses Verlangsamen kann auch durch das zähe muzinöse Sekret des Eileiters erreicht werden. Allerdings kann über das Verhalten und den

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

genauen Verbleib der Spermien im Eileiter noch keine zuverlässige Aussage getroffen werden, die ein reales Model des Spermien-Transports wiedergeben. Gründe hierfür sind unter anderem die zu große Verteilung und die Anzahl der Spermien in verschiedenen untersuchten Geweben des menschlichen Eileiters (Suarez 2008; Wilcox u. a. 1995).

1.10.1. Molekulare Grundlagen des Spermien-Eileiter Interaktion

Es existieren diverse molekulare Modelle, die die Interaktion zwischen Spermium und Eileiter beschreiben. In einigen Säugetiermodellen wird postuliert, dass die Lebensfähigkeit und damit die Fertilität von Spermatozoen durch die Verhinderung der Kapazitation und den damit einhergehenden Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle erhalten wird (Suarez und Pacey 2006). Eine Vermutung ist, dass eine steigende Ca^{2+} -Konzentration durch eine Katalase verhindert wird. Diese konnte in bovinen Eileitern nachgewiesen werden und einen frühzeitigen Mangel von Kalzium somit verhindern (Lapointe u. a. 1998).

Die Spermienmotilität ist bei der Reservoir Bildung wie schon zuvor beschrieben ein wichtiger Faktor für die Passage durch den uterotubalen Übergang. Durch den Kohlehydrat-Mechanismus existiert ein molekulares Schlüssel-Schloss-Prinzip, welches die Interaktion zwischen Eileiter und Spermien-Membran-Proteinen vermittelt (Feugang 2017). Die Bindung zwischen Eileiter und Spermium wird in vielen Tiermodellen als eine spezies-spezifische Kohlehydratbindung beschrieben. Diese Reste befinden sich auf den Zilien der Eileiter, wobei Fucose als Mediator bei Rindern (Lefebvre u. a. 1997) und Sialinsäure in Hamstern (DeMott u. a. 1995) fungiert. Die Bindung von Pferde-Spermien im Reservoir wird durch Galactose (Lefebvre u. a. 1995) vermittelt, die von Schweinen durch Mannose (Green u. a. 2001). Diese Aussagen wurden getroffen, nachdem die entsprechenden Zucker eine Bindung an das Epithel in vivo verhinderten.

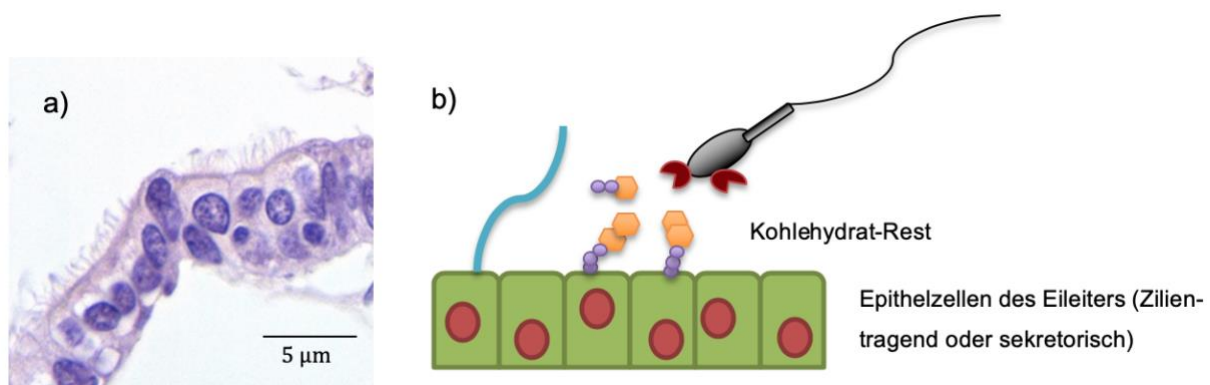


Abbildung 4: a) Humanes Epithel der Ampulle (HE gefärbt), b) Model zur Bildung der Spermien-Eileiter Interaktion

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Auf der Spermatozoen-Seite spielen verschiedene Bindungsproteine eine wichtige Rolle – etwa wie Fertilin β , Calmegin und Testis-spezifisches Angiotensin converting Enzym (ACE). (Susan S. Suarez 2016). Das Wissen über die Rezeptor-Moleküle, welche die Kohlehydratreste beinhalten oder erkennen ist noch unzureichend. Annexin-Proteine A1, A2, A4 und A5 wurden als solche bei Rinderspermien-Rezeptoren erkannt. Sie konnten auf der Oberfläche von bovinen Eileitern nachgewiesen werden und Antikörper gegen sie vermindert die Bindung der Spermien in vitro (Ignotz u. a. 2007)

Bisher konnte keine Studie einwandfrei nachweisen, dass die humane Spermien-Eileiter Interaktion kohlehydrat-vermittelt stattfindet. Im Jahr 2003 wurde die Aminosäure-Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) identifiziert, die evtl. eine Rolle in der Bindung in der Isthmus-Region des Ovidukts spielt, nicht jedoch in der Ampullen-Region (Reeve u. a. 2003).

1.10.2. Bedeutung für die natürliche und künstliche Befruchtung

Schon 1981 wurde das Spermien-Reservoir als die Interaktion von Spermien mit dem Epithel im weiblichen Genitaltrakt beschrieben (Hunter 1981). Es wurde vermutet, dass eine Spermien-Interaktionen mit Epithelzellen vor einer Polyspermie-Befruchtung in vielen verschiedenen Spezies schützen (Harper 1973; Suarez 2002). Diese und noch einige andere Funktionen verdeutlichen die Wichtigkeit molekular-basierte Studien durchzuführen, um die Befruchtungsfähigkeit von Spermien besser zu verstehen bzw. potenziell neue Therapieansätze aufzuzeigen. Im Ganzen gesehen, helfen uns optische Hilfsmittel und das Lebend-Zell-Imaging, sowie die Spermien-Markierung mit verschiedenen Marken eine Einsicht in die Spermienverteilung und ihr Verhalten im weiblichen Genitaltrakt nach der Insemination zu bekommen (Feugang 2017).

2. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im ersten Teil mit der molekularen Untersuchung der Spermienmotilität und dem Einfluss von Glykolsäure auf progressive Bewegung. Zudem sollen molekulare Mechanismen der Kalzium-Aufnahme und deren Zusammenhang mit der Aufnahme von Glykolsäure in die Spermienzelle untersucht werden. Hierzu wurden Ejakulate von 12 Bullen, 2 Schweinen und 11 Männern untersucht und im Anschluss daran mit verschiedenen Konzentrationen mit Glykolsäure inkubiert. Alle Ejakulate wurden dann in zeitlichen Intervallen hinsichtlich der Spermienmotilität untersucht. Bei der Untersuchung humaner Ejakulate wurden frische mit kryokonservierten auf die Wirkung von Glykolsäure miteinander verglichen. Weitere Untersuchungen erfolgten, um andere Faktoren, welche Einfluss auf die Motilität haben könnten zu differenzieren. Hierzu erfolgten zusätzliche Versuchsreihen mit verschiedenen Zuckern im Medium der Spermien. Die Fragestellung war hierbei, ob die Glykolsäure über Zucker-Transporter, über Ca^{2+} -Transporter oder über andere Mechanismen in das Spermium aufgenommen wird.

Auch der Einfluss von Kalzium und dessen Abwesenheit in Bezug auf die Beweglichkeit der Spermien wurden untersucht. Letztlich sollte mittels Kalzium-Imaging im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden, ob Glykolsäure einen vermehrten Kalzium-Einstrom in den Intrazellulären Raum des Spermiums bewirkt und über ähnliche oder gleiche Kanäle in die Zelle aufgenommen wird. Zur besseren graphischen Darstellung wurden einige Proben zusätzlich mit dem Durchflusszytometer auf die Kalzium-Konzentration hin untersucht. Um die Einwirkung des Kalzium-Kanals CatSper1 auf die Beweglichkeit zu untersuchen, wurde primär das Protein CatSper1 mittels Westerblot in humanen und bovinen Spermien nachgewiesen. Im Anschluss wurden die Ejakulate mit dem gleichen Versuchsaufbau mit einem CatSper1-Blocker in verschiedenen Konzentrationen bezüglich ihrer Motilität hin untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Spermien-Plasmamembran der Spermien von 102 Männern untersucht, welche sich in der andrologischen Sprechstunde im Klinikum der Universität München aus verschiedenen diagnostischen Gründen vorstellten. Es wurde untersucht, ob verschiedene Zucker an die Oberfläche der Spermien binden und ob sich diese in Verbindung mit den übrigen Spermioogramm-Parametern zu einer Vorhersage der Fertilität eignen. Der Hintergrund ist die Vermutung, dass die Bildung eines Spermien-Speichers im Eileiter kohlehydrat-vermittelt ist und die Bindungseigenschaften der Spermien in molekularer Hinsicht variieren können. Hierzu wurden die Ejakulate aufbereitet und mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern markiert. Die Intensität der Fluoreszenz und Anzahl der Spermien mit

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

gebundenen Zuckern wurde ausgezählt und mit den übrigen Spermogramm-Parametern verglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Aufbau und die Funktion der Plasmamembran von Spermatozoen besser zu verstehen und diese Parameter mit der Funktionalität und Fertilität von Spermien jenseits des Spermogramms zu verknüpfen. Die Kenntnis des Glykosylierungsmusters der Spermatozoen soll die andrologische Diagnostik verbessern und innovative Ansätze für effektivere Behandlungsmethoden bei männlicher Infertilität schaffen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Ethikvotum

Für die Studien zur Beweglichkeit der Spermien (bovin, porcine und human) und zur Untersuchung der Spermienplasmamembran (human) wurden der Ethikantrag 371-12 der Ludwig-Maximilians-Universität eingereicht und von der Ethik-Kommission bewilligt. Die Röhrchen mit Bullenspermien wurden von der Firma swissgenetics (Schweiz) in kryokonserviertem Zustand ohne kommerzielle Ansprüche zur Verfügung gestellt. Frisches Schweineejakulat wurde vom Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie (Moorversuchsgut, Oberschleißheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Studienpopulationen

Für die Versuche mit Bullenspermien wurden die kryokonservierten Ejakulate (jeweils mehrere Röhrchen pro Tier) von insgesamt 12 verschiedenen Bullen verwendet. Über die Gewinnung der Ejakulate ist nichts bekannt, alle Bullen wurden zu Zuchtzwecken eingesetzt. Die Ejakulate wurden nicht nummeriert, sondern anhand des Bullennamens unterschieden.

Die porcinen Ejakulate wurden frisch durch einen Ebersprung gewonnen und 1 h nach Erhalt direkt vor Ort aufbereitet und untersucht.

Die humanen Ejakulate wurden im andrologischen Institut der Urologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität im Zeitraum von Februar 2016 bis Juli 2017 gewonnen. Zur Teilnahme wurden alle volljährigen Patienten befragt, die zur Abklärung der Fertilität in der Poliklinik vorstellig wurden und keine bekannte Azoospermie oder Aspermie aufwiesen. Die Teilnahme an den Studien erfolgte freiwillig.

Bei ungenügender Ejakulatmenge oder bei der Notwendigkeit der Abklärung weiterer Verschlussparameter wurden die Patienten von der Studie ausgeschlossen. Untersucht wurde nur Ejakulat, welches nicht mehr für diagnostische oder therapeutische Zwecke verwendet wurde. Die Patientenproben wurden für diese Studie mit einer fortlaufenden Nummer pseudonymisiert. Die Daten zu den Patienten mit zugehöriger Nummer wurden datenschutzgerecht und nicht einsehbar aufbewahrt. Ein Rücktritt von der Teilnahme an der Studie war jederzeit möglich, ohne dass dem Patienten hieraus Nachteile entstanden wären. Durch Unterschrift erklärte sich jeder Patient dazu bereit, an der Studie teilzunehmen.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Insgesamt wurden 102 Patienten in die vorliegende Studie zur Untersuchung von Oberflächenmarkern auf der Spermienplasmamembran eingeschlossen. Für die Studie über die Beweglichkeit mit Glykolsäure wurde frisches und kryokonserviertes humanes Ejakulat von insgesamt 10 verschiedenen Männern (Normozoospermie) untersucht.

3.1.3. Geräte

<i>Artikel</i>	<i>Hersteller</i>
Leica DM1000 Lichtmikroskop	Leica Microsystems; Wetzlar, GER
Leica DFC450 Kamera	Leica Microsystems; Wetzlar, GER
Counter AC-8	Karl Hecht GmbH; Sondheim, GER
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG; Hamburg, GER
MiniTherm CT	VIVASCIENCE; Göttingen, GER
Heizplatte für Eppendorff-Tubes	Peqlab – Biotechnologie GmbH; Erlangen, GER
Leica DM IRBE	Leica Microsystems; Wetzlar, GER
Pipettenset Eppendorff plus	Eppendorf; Hamburg, GER
Olympus Fluoreszenz Mikroskop	Olympus; Hamburg, GER
Olympus i8 Konfokal Mikroskop	Olympus; Hamburg, GER
Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop	Leica Microsystems; Wetzlar, GER
FACS Calibur	Beckton Dickinson, USA
Heizplatte Histoplate	Amersham Biosciences
Wasserbad	Julabo, Seelbach, GER
XCELL II tm blot module	Invitrogen, life technologies; Carlsbad, USA
XCELL SureLock tm electrophoresis cell	Invitrogen, life technologies; Carlsbad, USA
Electrophoresis supply – EPS 301	Amersham Biosciences
NanoDrop1000	Thermo Scientific; Braunschweig, GER

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

3.1.4. Verbrauchsmaterialien

<i>Artikel</i>	<i>Art. Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Safe-Lock Tubes 2,0ml	3012009 4	Eppendorf AG; Hamburg, GER
Reaktionsgefäße mit Deckel, Typ "SafeFit", 0,5ml natur	RK05	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
Reaktionsgefäße mit Deckel, Typ "EasyFit", 1,5 ml diverse Farben	RK1G	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
Kimtech Präzisionswischtücher	5511	Kimberly Clark; Reigate, USA
Deckgläser (High Precision) 24x50 mm	DH50	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
100er- SliBo Objektträgerbox	733011	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, GER
Wägeschalen 100 ml, 80x80x25	WAE2	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
Wägeschalen 100 ml, 115x85x15	WAB2	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
Pipettenspitzen lose, 100-1000 µl	PSBI	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
SuperFrostTM Plus Mikroskopobjektträger, 75 x 25 x 1 mm	J1800AM NZ	Thermo Scientific; Braunschweig, GER
Menzel-Gläser, Objektträger 76x26 mm	1401683	Thermo Scientific; Braunschweig, GER
FalconTM 15 mL Conical Tube	352096	BD Biosciences; Durham, USA
FalconTM 50 mL Conical Tube	352070	BD Biosciences; Durham, USA
Glas Pasteur Pipetten	7477.15	Brand GmbH, Wertheim, GER
Handschuhe Vasco Basic S	6810415	Braun; Meisungen, GER
96-Well Platte F-Form	MTF	Hartenstein Laborversand; Würzburg, GER
Abdeckfolie selbstklebend	OV96	Hartenstein Laborversand; Würzburg, GER
BoltTM Empty Mini Gel Cassettes	NW2010	Life Technologies; Carlsbad, USA
BoltTM Empty Mini Gel Cassette Combs, 10-well	NW3010	Life Technologies; Carlsbad, USA

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Sponge Pad for XCell IITM Blotting	EI9052	Life Technologies; Carlsbad, USA
Immobilon-P Transfermembran, PVDF, 0,45 µm	IPVH000 10	Merck KGaA; Darmstadt, GER

3.1.5. Chemikalien

<i>Artikel</i>	<i>Art. Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
SpermFreeze medium 20 ml	LGSF-020	Life Global, USA
Glykolsäure	124737	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	3777	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
CatSper Channel Blocker NCC55-0396	357400-13-6	CaymanChemical, Michigan, USA
D(-)Fructose	F3510	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
D(+)-Glucose	G7021	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dako Fluorescent Mounting Medium	S302380-2	Agilent Technologies; Glostrup, DEN
Ethanol absolut EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	1.009.835.000	Merck, KGaA, Darmstadt, D
NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent	R37605	Life Technologies; Carlsbad, USA
NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent	R37606	Life Technologies; Carlsbad, USA
Calcium chloride dihydrate ACS reag. ≥99 %	223506	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween-20	P1379	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
D(+)-Mannose	M8574	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Sodium chloride Reag. ACS, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur.	31434	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Potassium chloride, Reag. ISO, Reag. Ph. Eur.	31248	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Sodium phosphate dibasic dihydrate ≥ 99 % (T)	71643	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Potassium phosphate monobasic ≥ 99 % (Sigma)	P5655	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Magnesium chloride hexahydrate ACS reag. 99.0 - 102.0 %	M9272	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
PFA		
HEPES ≥ 95 % (titration)	H3375	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Polyvinyl alcohol 4-88	81381	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Sodium bicarbonate ACS reag.	S6014	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
JC-1 Dye (Mitochondrial Membrane Potential Probe)	T3168	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Fluo-4, AM, cell permeant	F14217	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Trizma® Hydrochloride	T-6666	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Trizma® Base	T-1503	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
MagicMark™ XP Western Protein Standard	LC5603	Life Technologies; Carlsbad, USA
Acrylamid 4K - Lösung (30 %) - Mix 37,5:1	A1672	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER
Glycin	A1067	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER
SDS - Lösung 20 %	A0675	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER
SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets	S8820	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard	LC5625	Life Technologies; Carlsbad, USA
Methanol, ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	1.310.911.214	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

3.1.6. Pufferlösungen

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Fixierlösung (50 ml)	2 % PFA
	0,3 % Tween-20
	0,2 % Triton X-100
	ad Aqua dest.
PBS pH 7,4 (1000 ml)	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,44 g Na ₂ HPO ₄
	0,24 g KH ₂ PO ₄
	ad Aqua dest.
Sperm iTALP Puffer	99 mM NaCl
	3.1 mM KCl
	25 mM NaHCO ₃
	0.35 mM NaH ₂ PO ₄ - H ₂ O
	0.5 mM HEPES
	2.0 mM CaCl ₂ - 2 H ₂ O
	1.1 mM MgCl ₂ - 6 H ₂ O
	0.25 - 0.5 mg/ml PVA
ad Aqua dest.	
Lämmli-Puffer	0,302 g Tris Base
	5 ml 20% SDS
	20ml Glycerol
	22,3 mg Sodium phosphate decahydrate
	9,2mg Sodium orthovanadate
	0,5 Tbl Proteinase Inhibitor
TBST 10x pH 7,5	100ml Tris-HCl (1M) pH 8

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

	300ml NaCl (5M)
	20ml Tween 20
	ad Aqua dest.
SDS-page Laufpuffer 10x	30 g Tris Base
	144 g Glycin
	10 g SDS
	ad Aqua dest.
Blotpuffer für Western Blot (1000 ml)	3,032 g Tris Base
	14,4 g Glycin
	200 ml Methanol
	ad Aqua dest.
Loading Buffer 5x pH 6,8	2,4 ml Tris HCP (1M)
	3ml 20% SDS
	3ml Glycerol
	1,6ml β -Mercaptoethanol
	0,004% Bromphenolblau

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

3.1.7. Antikörper und FITC-konjugierte Zucker

<i>Bezeichnung</i>	<i>Art. Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	31466	Life Technologies; Carlsbad, USA
Anti-CatSper1 Antibody produced in rabbit	sc-393749	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
α -L-Fucose-PAA-fluor	03-007	GlycoTech Corporation; Frederick, USA
α -D-Mannose-PAA-fluor	03-005	GlycoTech Corporation; Frederick, USA
β -GlcNAc-PAA-fluor	03-009	GlycoTech Corporation; Frederick, USA
α -D-Galactose-PAA-fluor	03-003	GlycoTech Corporation; Frederick, USA

3.2. Methoden

3.2.1. Aufbereitung der Ejakulate

Bovin

Die Röhrcchen zu je 180 μ l Ejakulat wurden von der Firma swissgenetics (Schweiz) in flüssigem Stickstoff (ca. – 273 °C) eingefroren und geliefert. Für die Aufbereitung des Ejakulates wurden je zwei bis fünf Röhrcchen von je einem Bullen nach Namen sortiert und schonend bei 37 °C im Wasserbad für 30 Sekunden und danach bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt in ein Eppendorff-Gefäß überführt und bei 800 rpm für 4 min bei 30 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in gleicher Menge Sperm iTALP Puffer pH 7,4 resuspendiert und zur weiteren Verwendung bei 37 °C auf der Heizplatte stehen gelassen.

Human

Die humanen Ejakulate wurden zur Kryokonservierung mit SpermFreeze Puffer nach Herstellerangaben verdünnt und eingefroren in flüssigem Stickstoff im andrologischen Forschungslabor. Zum Auftauen wurden die Röhrcchen bei Raumtemperatur in der Hand und anschließend auf einem Heizblock bei 37 °C gerollt. Nach Überführung in ein Eppendorff-

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Gefäß wurden die Ejakulate (frisch oder kryokonserviert) bei 30 °C bei 1000 rpm für 4 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde in Sperm iTALP pH 7,4 resuspendiert und zur weiteren Verwendung bei 37 °C auf einem Heizblock gelagert.

Porcin

Die frischen Proben wurden nach Gewinnung in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und ihre Konzentration mit einem Lichtmikroskop (400x) bestimmt. Im Anschluss daran wurden die Proben stark mit Sperm iTALP Medium auf ca. 20-40 mio/ml verdünnt. Nach Überführung in ein Eppendorff-Gefäß wurden die Ejakulate (frisch oder kryokonserviert) bei 30 °C bei 1000 rpm für 2 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde in Sperm iTALP pH 7,4 resuspendiert und zur weiteren Verwendung bei 37 °C auf einem Heizblock gelagert.

3.2.2. Versuchsaufbau mit verschiedenen Puffern

Die Ejakulat Proben wurden für die Versuche auf eine Spermienkonzentration von ca. 20 mio/ml verdünnt, um besser zählen zu können. Die Reagenzien wurden in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt und durch eine zweite Person randomisiert. Für die Zählung wurden pro Gefäß 7,5 µl Probe entnommen und nach den jeweiligen Inkubationszeiten an einem Lichtmikroskop mit 400facher Vergrößerung verblindet (ohne zu wissen, welches Agens enthalten war) ausgezählt. Hierbei wurden die Spermatozoen nach WHO Klassifikation in die Gruppen A, B, C und D (Beschreibung siehe Einleitung) eingeteilt und pro Reaktionsgefäß zweimal je 200 Zellen über mindestens 5 verschiedene Gesichtsfelder ausgezählt. Es wurden folgende Versuchsreihen angelegt:

Humane Ejakulate		
<i>Glykolsäure</i>	<i>Zucker</i>	<i>Catsper Blocker</i>
Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
30 mM	16 mM GA	3 µM
60 mM	16 mM Glukose	10 µM
	16 mM Fructose	3 µM + 60 mM GA
		10 µM + 60 mM GA

Tabelle 3: Versuchsreihen mit humanen Spermien

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Bovine Ejakulate

<i>Glykolsäure</i>	<i>Zucker</i>	<i>Catsper Blocker I</i>
Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
30 mM	16 mM GA	3 μ M
60 mM	16 mM Glukose	10 μ M
	16 mM Fructose	3 μ M + 60 mM GA
		10 μ M + 60 mM GA

Tabelle 4: Versuchsreihen mit bovinen Ejakulaten

Porcine Ejakulate

Glykolsäure

Kontrolle

3 mM

10 mM

Tabelle 5: Versuchsreihen mit porcinen Ejakulaten

3.2.3. Anfertigung von Ausstrichen

Für die Fixierung von Ejakulat Proben und deren Vorbereitung für die Mikroskopie wurden je 8 μ l der Ejakulate (mit PBS auf ca. 20 mio/ml Spermien verdünnt) auf einen Objektträger gegeben und auf einer Heizplatte bei 37 °C getrocknet und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.2.4. Fluoreszenz-Färbungen

Für die Aufbereitung der Ejakulate für die Fluoreszenz- und Konfokale Mikroskopie wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut und für 30 min in einer lichtgeschützten Feuchtkammer mit Fixierlösung (siehe Kapitel 2.1.6.) bedeckt. Danach wurden die Objektträger mit PBS einmal kurz gespült, bevor sie mit 1 % BSA in PBS pH 7.4 Lösung für weitere 30 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubierten. Dieser Schritt verhinderte die unspezifische Bindung der Fluoreszenzfarbstoffe an Oberflächenproteine der Plasmamembran der Spermien.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Im Anschluss daran wurde die Lösung von den Objektträgern abgekippt und die Spermien für 1 h mit Färbelösung bedeckt. Auch dieser Schritt fand lichtgeschützt in Feuchtkammern bei Raumtemperatur statt. Die Färbelösung bestand aus den folgenden Agenzien.

<i>Reagens</i>	
NucBlue®TMFixedCell ReadyProbes™ Reagent	2 Tropfen
FITC-konjugierter Zucker	30 µg/ml
Mitotracker DeepRed®	500 nM
Aqua dest.	1000 µl

Tabelle 6: Färbelösung für Spermien-Ausstriche

Mitotracker DeepRed® wurde nur bei einigen Kontrollproben als Färbelösung zusätzlich verwendet, um Mitochondrien im Mittelstück auf dem Bild besser darstellen zu können. Dieser wurde allerdings schon vor dem Trocknen der Ejakulat Probe lichtgeschützt hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Reagenz NucBlue® (ThermoScientific Fisher, Braunschweig, D) enthält den Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), welcher sich in die DNS einlagert und diese so für die Fluoreszenzmikroskopie markiert.

Nach der Inkubation mit Färbelösung wurden die Proben dreimal mit PBS pH 7.4 gewaschen, mit einem Tuch trocken getupft und anschließend mit DakoMounting Medium und einem Deckglas bedeckt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ®.

3.2.5. Proteinextraktion von Spermien

Kryokonservierte Ejakulate wurden vorsichtig aufgetaut (Prozedur siehe Kapitel 2.1.6.). Anschließend wurden die Proben mit 750 µl PBS pH 7.4 aufgefüllt und für 4.5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl PBS pH 7.4 resuspendiert. Anschließend wurde ein zweites Mal bei 1000 rpm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet je nach Größe mit maximal 50 µl Lämmli-Puffer resuspendiert. Mit einem Homogenisator wurde die Lösung im Anschluss daran 1 min manuell homogenisiert, bevor die Lösung für 2 min in ein Ultraschallbad gegeben wurde.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Anschließend wurden die Lösungen für 5 min bei 99 °C in einem Heizblock inkubiert und im Folgenden abermals zentrifugiert für 5 min bei 1000 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit einem Nanodrop1000 gemessen. Für weiterführende Untersuchungen wurden die Proteinextrakte bei -20 °C eingefroren.

3.2.6. SDS-PAGE und Western Blot

Für die Auftrennung der Proteine wurde eine Kassette mit Trenn- und Sammelgel hergestellt. Für die Laufeigenschaften der aufzutrennenden Proteine wurde ein 10 %iges Acrylamid-Gel hergestellt. Die Zusammensetzung kann aus Tabelle ... entnommen werden.

Die Kassette wurde nach Herstellerangaben in die Elektrophorese-Box „XCELL SureLock® tm electrophoresis cell“ eingesetzt und entsprechende Puffer (Laufpuffer, siehe Kapitel 2.1.6.) hinzugefügt. Für die Standards wurden je 3 µl von MagicMark™ XP Western Protein Standard und SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard in die erste und zweite Tasche aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine Menge von 25 µg pro Probe konzentriert und nach dem folgenden Schema für 5 min bei 95 °C inkubiert.

<i>Reagens</i>	<i>20 µl</i>
Protein-Extrakt	25 µg
Loading Buffer 5 x	4 µl
Aqua dest.	Nach Bedarf

Tabelle 7: Reagenz-Zusammensetzung für die Auftragung auf SDS-Gel

Zum Sammeln wurde an das Gel eine Spannung von 80 V für 30 min angelegt. Um die Proteine aufzutrennen, wurden 120 V für weitere 60 bis 90 min angelegt. Die Zeit wurde von der Laufstrecke des SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard abhängig gemacht.

Nach dem Auftrennen wurde das Gel aus der Kammer gelöst und nach Herstellerangaben in ein Blotting Modul „XCELL II tm blot module“ zusammen mit einer PVDF 0.45 mm Membran gegeben. Die Membran wurde zuvor aktiviert, indem sie für 1 min in Methanol bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der Puffer in der Apparatur wurde durch einen Blotting

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Puffer (siehe Kapitel 2.1.6.) ersetzt. Zum Übertragen der Proteine auf die PVDF Membran wurden 20 V Spannung für 90 bis 120 min angelegt.

3.2.7. Immunostaining Anti-CatSper Antikörper

Die PVDF Membran wurde nach der Übertragung der Proteine dreimal für jeweils 5 min mit TBST Puffer pH 7.4 gewaschen. Danach wurde die Membran in 5 % Magermilch in TBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der CatSper-Antikörper sc-393749 (rabbit) wurde im Verhältnis 1:400 in 5 % Magermilch in TBST gelöst und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran abermals dreimal für jeweils 5 min mit TBST gewaschen. Der zweite Antikörper Anti-rabbit HRP wurde im Verhältnis 1:5000 in 5 % Magermilch in TBST gelöst und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmals dreimal für jeweils 5 min in TBST gewaschen. Vor Analyse wurde die PVDF Membran lichtgeschützt mit ECL Substrat bedeckt und direkt danach analysiert.

3.2.8. Kalzium Imaging und Fluoreszenz-Mikroskopie

Für den Nachweis der Kalziumaufnahme der Spermien wurden frische humane Proben zunächst für 4,5 min bei 800 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Ejakulat stammte von einem Spender mit Normozoospermie und eigenen Kindern. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in Sperm iTALP Puffer pH 7.4 resuspendiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in aufrechter Position (ca. 30° Neigung) aufgestellt und bei 37 °C für 30 min stehen gelassen. Anschließend daran wurde mit der Pipette nur Flüssigkeit der oberen zwei Drittel der Ejakulat Probe vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt („Swim up“ der Spermien). Diese Vorgehensweise sorgte dafür, dass nur lebende, intakte Spermien für anschließende Untersuchungen verwendet wurden. Die Spermien wurden hierfür zunächst in zwei Gruppen eingeteilt, einmal Puffer mit BSA und einmal Puffer ohne BSA. Die Einteilung der Versuchsgruppen kann in folgender Tabelle eingesehen werden.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

<i>BSA</i>	<i>Ohne BSA</i>
Kontrolle	Kontrolle
3 μ M CatSper Blocker	3 μ M CatSper Blocker
30 mM GA	30 mM GA
3 μ M Blocker + 30 mM GA	3 μ M Blocker + 30 mM GA

Tabelle 8: Versuchsaufbau Kalzium-Imaging von humanen Spermien

Nach der Unterteilung in die verschiedenen Versuchsgruppen, wurde den Reaktionsgefäßen Fluo4AM (Konzentration 5 μ g/ml) hinzugefügt und diese für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden auf einer 96-Well Platte verteilt und die mittlere Fluoreszenz-Intensität bei 488 nm gemessen.

Nun wurde eine Ca^{2+} -Lösung (Endkonzentration 12 mM) zur Probe hinzugegeben und die Probe nochmals auf Fluoreszenz in Echtzeit über einen Zeitraum von 2 min analysiert. Zur Kontrolle wurden auch Ejakulat Proben ohne Kalzium aber mit entsprechenden Reagenzien als Kontrollen analysiert. Hierzu wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus) verwendet.

3.2.9. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) Analysen

Um die Ergebnisse des Kalzium-Imaging zu validieren und mitochondriale Aktivität zu vergleichen wurden die Ejakulat Proben (human und bovin) wie in den folgenden Kapiteln beschrieben verarbeitet und mit Fluo4AM und JC-1 markiert. Die Proben wurden lichtgeschützt transportiert und mit einem Durchflusszytometer (FACS Calibur, Beckton Dickinson) analysiert. Die Fluoreszenz-Intensität wurde mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm analysiert und pro Versuchsansatz jeweils 20.000 Zellen gezählt. Die Auswertung wurde mit dem Programm FlowingSoftware2.0 (Turku University, Finnland) durchgeführt.

3.2.10. Statistische Methoden

Soweit nicht anders angegeben wurden die Analysen mit dem von GraphPad entwickeltem Programm Prism9™ durchgeführt. Für die Analysen wurden für direkte Vergleiche gepaarte t-Tests verwendet, wenn von einer Standardnormalverteilung ausgegangen werden konnte.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Zusätzlich wurde für die Gruppen mit zeitlichem Verlauf und verschiedenen Gruppe ein doppelseitiger ANOVA-Test durchgeführt.

4. Ergebnisse

Bei allen folgenden Versuchsreihen bezieht sich der Zeitpunkt $t = 0$ auf die direkte Messung der Versuchsprobe nach Zugabe des Agens. Diese Messung variierte - bezogen auf die Zeit, die für die Messung benötigt wurde - zwischen 10 s und 5 min.

4.1. Allgemeine Motilitätsbestimmung humaner ($n=10$), boviner ($n=10$) und porciner ($n=2$) Spermien

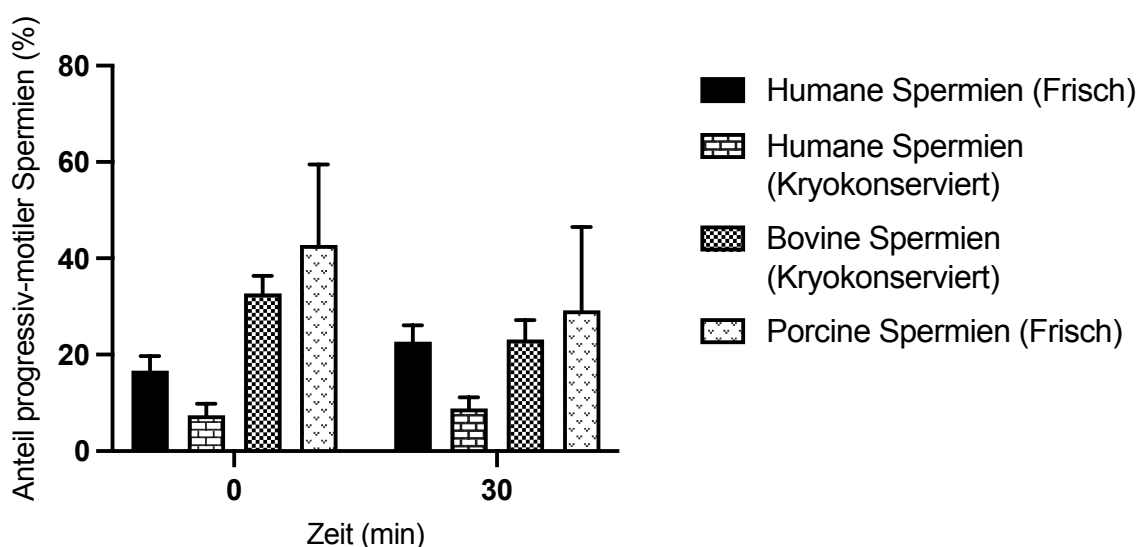


Abbildung 5: Allgemeine Motilitätsbestimmung humaner ($n=10$), boviner ($n=10$) und porciner ($n=2$) Spermien am Beginn der Untersuchung und nach 30 Minuten

Die allgemeine Motilitätsbestimmung zeigt, dass der prozentuale Anteil der Spermien mit A und B Beweglichkeit verschieden zwischen den verschiedenen Spezies als auch abhängig von der Frische oder Kryokonservierung ist. Frische humane Proben weisen in unseren Versuchen eine Vorwärtsbeweglichkeit von 16.7 ± 3.0 % auf, während bei kryokonservierten humanen Proben eine Beweglichkeitsrate von 7.5 ± 2.4 % erreicht wurde. Beide humanen Gruppen zeigen einen Trend zur Verbesserung der vorwärts beweglichen Spermien auf 22.7 ± 3.4 % bei den frischen und 8.8 ± 2.4 % bei den kryokonservierten Proben nach Adaptierung an die Pufferbedingungen.

Bovine Samenproben zeigen hingegen nach Auftauen 32.7 ± 3.7 % vorwärts bewegliche Spermatozoen, diese Vorwärtsbeweglichkeit fällt schon nach 30 min wieder ab auf 23.2 ± 4.0 %. Es konnten nur 2 porcine Proben gewonnen werden, deren Qualität variierte stark.

4.2. Spermien-Motilität mit Glykolsäure

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von Glykolsäure dargestellt. Die Daten beziehen sich auf einen experimentellen Zeitrahmen von 90 min.

4.2.1. Human frisch (n = 10)

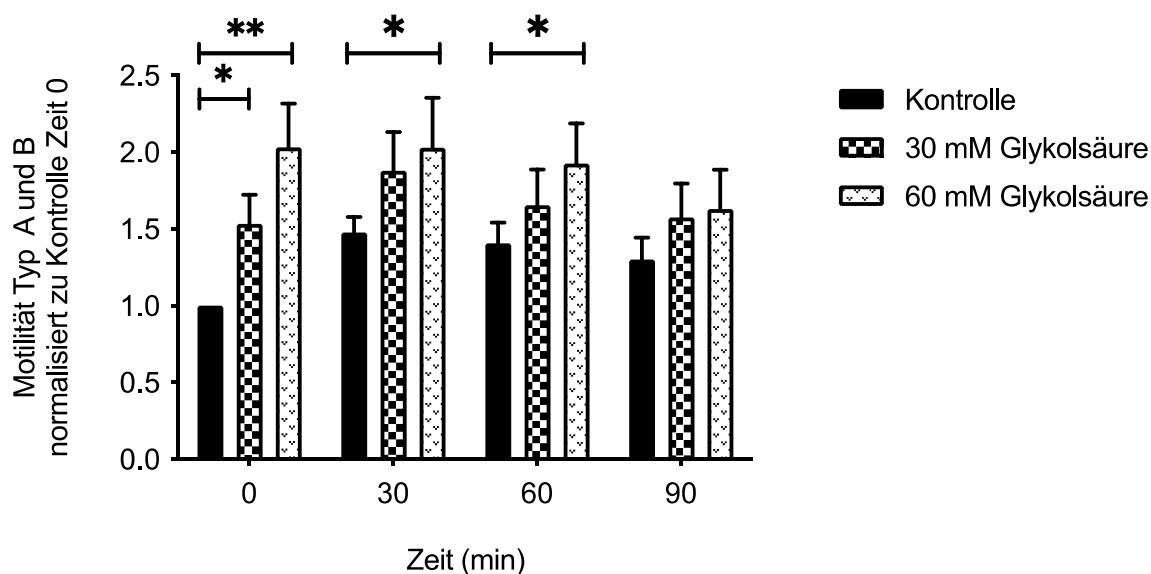


Abbildung 6: Motilität frischer humaner Samenproben (n=10) unter dem Einfluss von 30mM und 60 mM Glykolsäure

Zeit (min)	Reagenz	n	Kontrolle	Behandelt	p
0	30 mM GA	10	1	1.53 ± 0.19	0.02
	60 mM GA	10	1	2.03 ± 0.29	0.0056
30	30 mM GA	10	1.45 ± 0.10	1.88 ± 0.25	0.057
	60 mM GA	10	1.45 ± 0.10	2.03 ± 0.32	0.04
60	30 mM GA	10	1.40 ± 0.13	1.65 ± 0.23	n.s.
	60 mM GA	10	1.40 ± 0.13	1.93 ± 0.27	0.038
90	30 mM GA	10	1.30 ± 0.14	1.57 ± 0.22	n.s.
	60 mM GA	10	1.30 ± 0.14	1.63 ± 0.26	n.s.

Tabelle 9: Statische Auswertung Motilität frischer humaner Samenproben

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Die Daten der Versuchsreihe von humanen Spermien mit verschiedenen Konzentrationen von Glykolsäure zeigen Variabilität in der Motilität. In unserem Experiment konnten wir beobachten, dass die A und B Motilität zusammengefasst bei den Spermien mit 60 mM Glykolsäure signifikant ansteigt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Faktor 2.03 ± 0.42) gleich nach Zugabe des Agens (** $p < 0.001$) und auch nach 30 min (2.03 ± 0.49 , * $p < 0.05$) und 60 min (1.92 ± 0.19 , * $p < 0.05$). Auch schon mit 30 mM Glykolsäure konnten wir gleich nach Zugabe einen Anstieg der Motilität (1.53 ± 0.28) beobachten (* $p < 0.05$). Gleichzeitig sehen wir, dass der Trend der anhaltend hohen Motilität scheinbar bis 90 min nach Versuchsstart anhält, die hier gewonnenen Werte allerdings nicht ausreichen, um eine validierte Aussage hierüber treffen zu können. Interessant ist der Anstieg der Motilität der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 30 min. Danach fällt die Gesamt-Motilität der humanen Spermien ab, je weiter die Zeit voranschreitet.

4.2.2. Human kryokonserviert (n = 9)

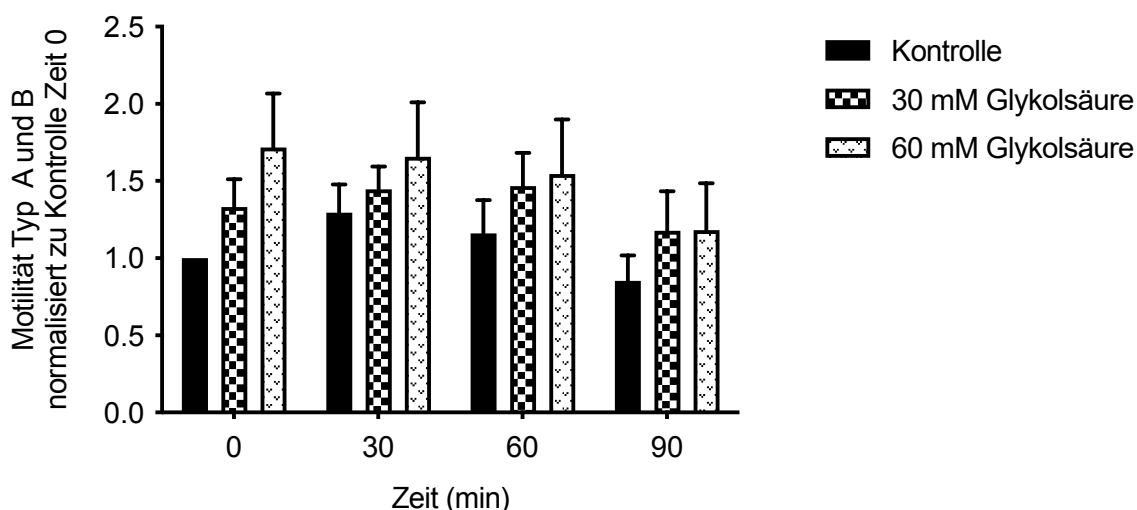


Abbildung 7: Motilität kryokonservierter humaner Samenproben (n=9) unter dem Einfluss von Glykolsäure

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

<i>Zeit (min)</i>	<i>Reagenz</i>	<i>n</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Behandelt</i>	<i>p</i>
0	30 mM GA	9	1	1.33 ± 0.18	0.02
	60 mM GA	9	1	1.71 ± 0.35	0.0056
30	30 mM GA	9	1.29 ± 0.18	1.45 ± 0.15	0.057
	60 mM GA	9	1.29 ± 0.18	1.66 ± 0.35	0.04
60	30 mM GA	9	1.16 ± 0.21	1.47 ± 0.21	n.s.
	60 mM GA	9	1.16 ± 0.21	1.54 ± 0.35	0.038
90	30 mM GA	9	0.85 ± 0.16	1.18 ± 0.26	n.s.
	60 mM GA	9	0.85 ± 0.16	1.18 ± 0.30	n.s.

Tabelle 10: Statische Auswertung der Motilität kryokonservierter humaner Samenproben

In der Versuchsreihe nach Auftauen kryokonservierter Spermien konnte bei keiner der Versuchsreihen ein signifikanter Anstieg der A und B Motilität nach Zugabe von Glykolsäure beobachtet werden. Ein Trend hier scheint erkennbar, doch konnte dieser mit statistischen Tests nicht verifiziert werden. Auch hier zeigt sich, dass die Gesamt-Motilität der Spermien nach 30 min in der Kontrollgruppe anzusteigen scheint, um danach wieder mit der Zeit abzufallen.

1.1. Bovin kryokonserviert (n=10)

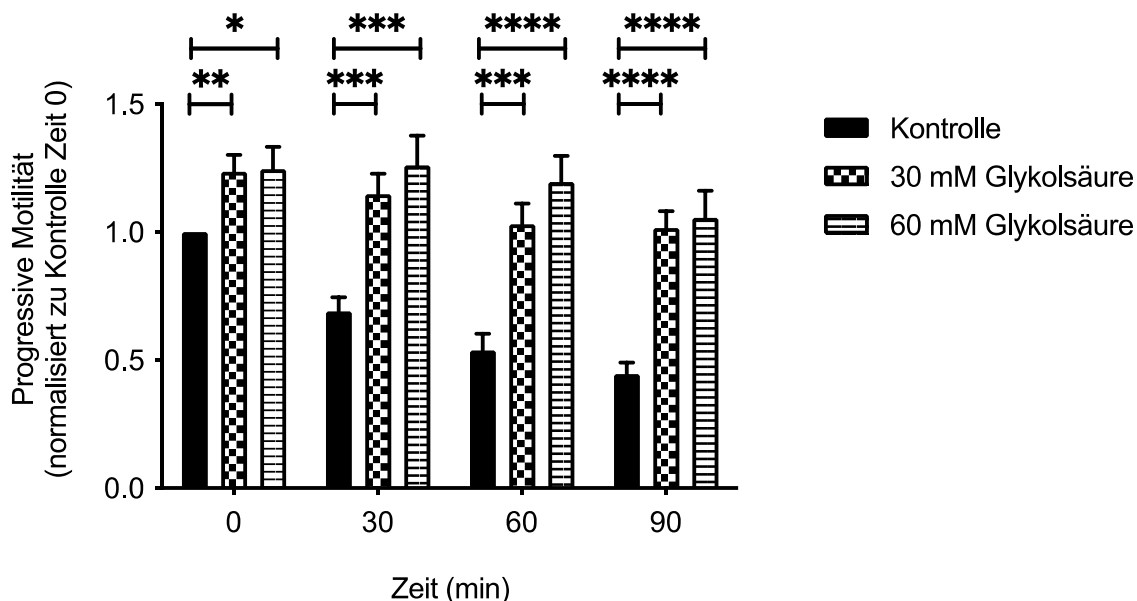


Abbildung 8: Motilität von kryokonservierten bovinen Samenproben (n=10) unter dem Einfluss von Glykolsäure

Zeit (min)	Reagenz	n	Kontrolle	Behandelt	p
0	30 mM GA	10	1	1.26 ± 0.07	0.0062
	60 mM GA	10	1	1.24 ± 0.09	0.022
30	30 mM GA	10	0.69 ± 0.06	1.14 ± 0.08	0.0002
	60 mM GA	10	0.69 ± 0.06	1.26 ± 0.12	0.0003
60	30 mM GA	10	0.54 ± 0.07	1.03 ± 0.08	0.0002
	60 mM GA	10	0.54 ± 0.07	1.19 ± 0.10	<0.0001
90	30 mM GA	10	0.47 ± 0.05	1.02 ± 0.07	<0.0001
	60 mM GA	10	0.47 ± 0.05	1.06 ± 0.11	<0.0001

Tabelle 11: Statistische Auswertung der Motilität kryokonservierter boviner Samenproben

Betrachtet man die Ergebnisse der Versuchsreihen von kryokonservierten bovinen mit 30 mM und 60 mM Glykolsäure, so kann man durch alle Versuche hindurch einen signifikanten Anstieg der A und B Motilität der Spermien erkennen. Zum Zeitpunkt 0 nach direkter Zugabe des Agens lässt sich ein signifikanter Anstieg des Anteils der beweglichen Spermien mit 30 mM (1.24 ± 0.10) und 60 mM (1.25 ± 0.13) Glykolsäure-Zugabe beobachten. Nach 30, 60 und 90 min ist dieser Effekt im Vergleich zur Kontrolle sogar noch prägnanter. Hier kann man

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Verbesserungen der A und B Motilität um den Faktor (1.14 ± 0.12) bei 30 mM und (1.26 ± 0.17) bei 60 mM erkennen. Selbst nach 60 bzw. nach 90 min sind die Samenproben mit Glykolsäure 30 mM (1.03 ± 0.12 und 1.02 ± 0.10) und 60 mM (1.19 ± 0.15 und 1.06 ± 0.15) bezüglich der Motilität noch auf dem Niveau oder sogar über dem Wert der Kontrollprobe zum Zeitpunkt 0. Verglichen mit dem Ausgangswert der Kontrolle konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass alle mit Glykolsäure 30 mM und 60 mM behandelten Samenproben einen signifikanten Anstieg des Anteils der A und B Gruppe beweglicher Spermien aufwiesen. (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.033$)

4.2.3. Porcin frisch (n=1)

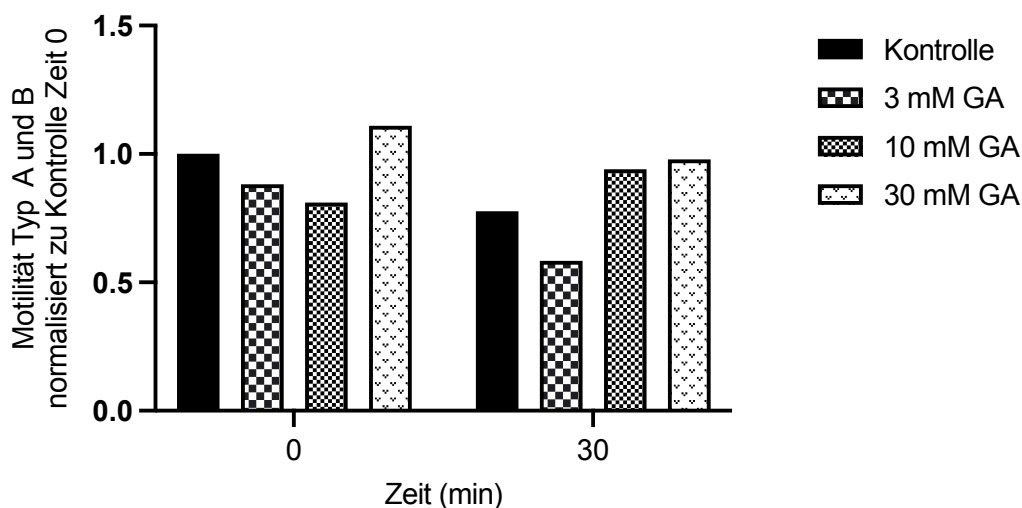


Abbildung 9: Motilität von frischen porcinen Samenproben (n=1) unter dem Einfluss von Glykolsäure

Bei den Schweineversuchen gestaltete sich das Setup der Versuche schwierig und so konnte nur eine Probe analysiert werden. Vorversuche zeigten, dass porcine Spermien bei der Zugabe von 60 mM stark an Motilität verloren. Deshalb wurde der Versuche nochmals mit geringeren Dosen (3 mM, 10 mM und 30 mM) Glykolsäure wiederholt. Da die Zeit limitiert war konnte der Versuch nur bis 30 min aufgezeigt werden. Es zeigt sich ein leichter Trend zur Besserung der Motilität nach 30 min bei 30 mM Glykolsäure-Zugabe. Allerdings kann bei n=1 keine genaue Aussage über die Wirkung von Glykolsäure auf Schweinespermien getroffen werden.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

4.3. Versuche mit Kalzium-Kanal Blocker (CatSper1-Blocker)

4.3.1. Human kryokonserviert (n=10)

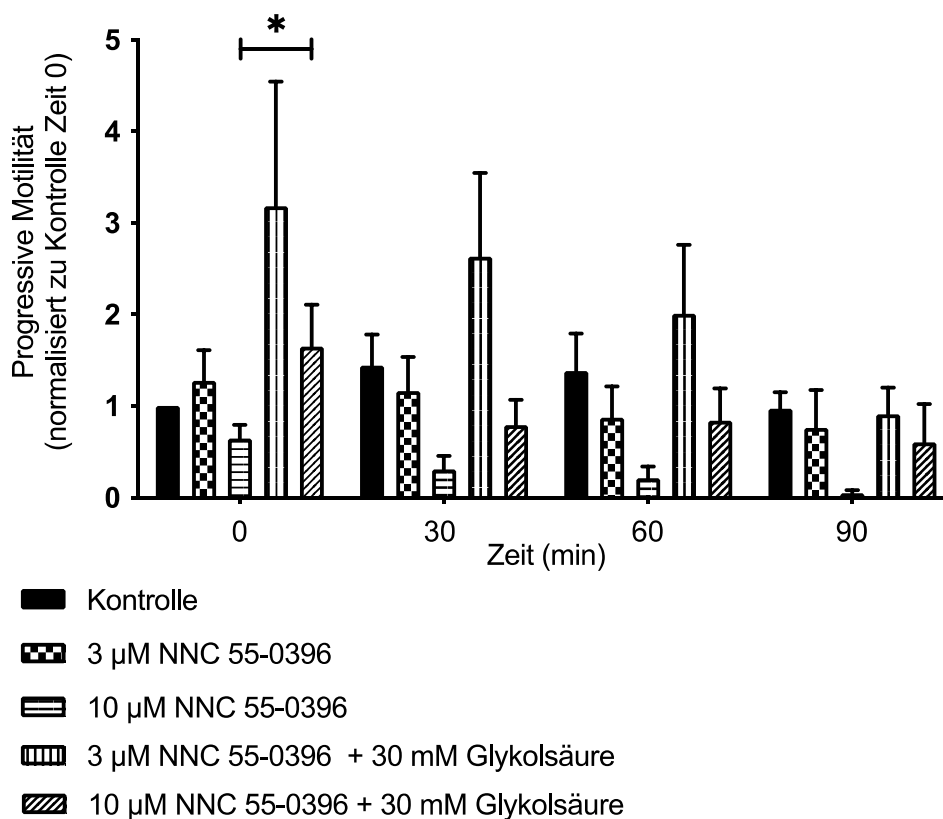


Abbildung 10: Motilität von kryokonservierten humanen Spermien (n=10) unter Einfluss von CatSper-Blocker und Glykolsäure

Bei den Versuchen mit humanen kryokonservierten Spermien mit dem Kalzium-Kanalblocker (CatSper1-Blocker) NNC- konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden. Bei Zugabe von 10 µM Blocker konnte über alle gemessenen Zeitpunkte hinweg ein signifikanter Abfall der A und B Motilität der Samenproben gezählt werden. Zum Zeitpunkt 0 war der Abfall schon ca. 40 %. (0.64 ± 0.15 , $*p < 0.05$). Auch während des Experiments blieb die Beweglichkeit der Spermien mit 10 µM eingeschränkt (0.31 ± 0.15 $**p < 0.01$, 0.21 ± 0.13 $**p < 0.001$, 0.05 ± 0.03 $*** p < 0.0001$). Beim Vergleich der anderen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der A und B Motilität festgestellt werden. Nur nach 60 min konnte eine signifikante Besserung der Gruppe 10 µM Blocker + GA im Vergleich zur Gruppe 10 µM Blocker beobachtet werden (0.21 ± 0.13 zu 0.84 ± 0.36 $*p < 0.05$). Es konnte festgestellt werden, dass die Proben mit Glykolsäure und Blocker keine signifikant bessere oder schlechtere Motilität aufwiesen als die Proben mit Blocker allein.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

<i>Zeit (min)</i>	<i>Reagenz</i>	<i>n</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Behandelt</i>	<i>p</i>
0	3 μ M Blocker	10	1	1.27 \pm 0.34	
	10 μ M Blocker	10	1	0.64 \pm 0.15	
	3 μ M Blocker + 30 mM GA	10	1.27 \pm 0.34	3.19 \pm 1.36	0.19
	10 μ M Blocker + 30 mM GA	10	0.64 \pm 0.15	1.65 \pm 0.46	0.05
30	3 μ M Blocker	10	1.44 \pm 0.34	1.16 \pm 0.38	
	10 μ M Blocker	10	1.44 \pm 0.34	0.31 \pm 0.15	
	3 μ M Blocker + 30 mM GA	10	1.16 \pm 0.38	2.63 \pm 0.91	0.15
	10 μ M Blocker + 30 mM GA	10	0.31 \pm 0.15	0.79 \pm 0.28	0.14
60	3 μ M Blocker	10	1.38 \pm 0.41	0.87 \pm 0.34	
	10 μ M Blocker	10	1.38 \pm 0.41	0.21 \pm 0.13	
	3 μ M Blocker + 30 mM GA	10	0.87 \pm 0.34	2.01 \pm 0.75	0.18
	10 μ M Blocker + 30 mM GA	10	0.21 \pm 0.13	0.84 \pm 0.36	0.11
90	3 μ M Blocker	10	0.97 \pm 0.18	0.76 \pm 0.42	
	10 μ M Blocker	10	0.97 \pm 0.18	0.047 \pm 0.03	
	3 μ M Blocker + 30 mM GA	10	0.76 \pm 0.42	0.91 \pm 0.29	0.77
	10 μ M Blocker + 30 mM GA	10	0.047 \pm 0.03	0.60 \pm 0.42	0.21

Tabelle 12: Statistische Auswertung der Motilität kryokonservierter humaner Samenproben mit Kalzium-Kanal-Blocker und Glykolsäure

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

4.3.2. Bovin kryokonserviert (n=7)

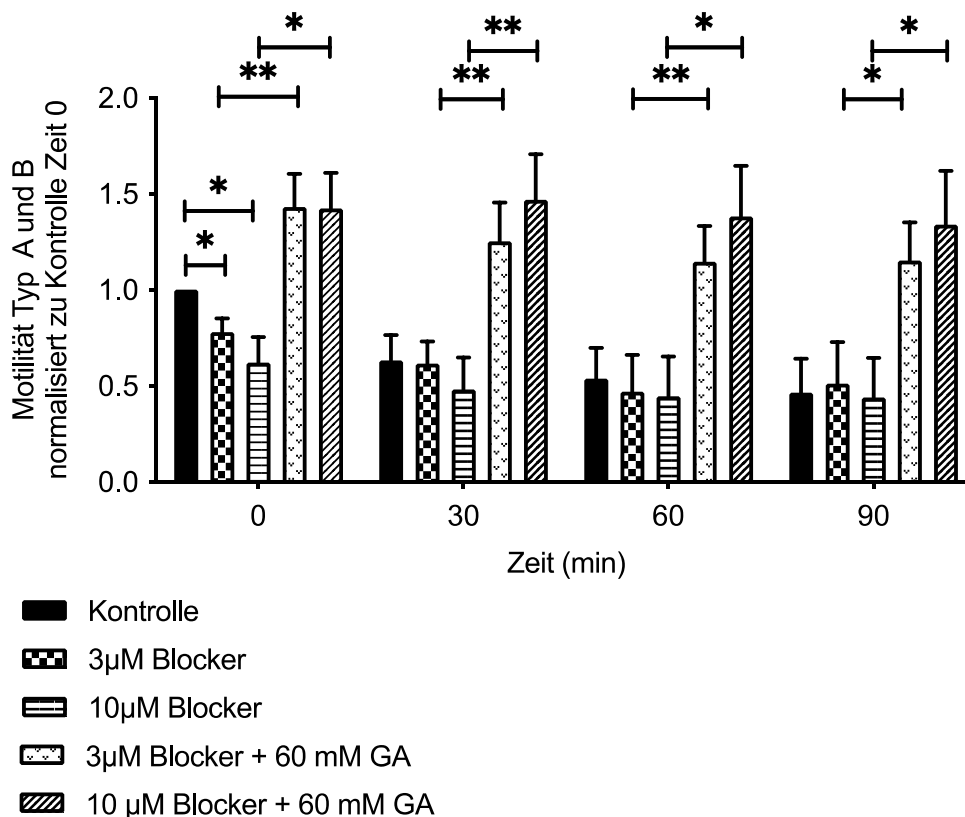


Abbildung 11: Motilität von kryokonservierten bovinen Samenproben (n=7) unter dem Einfluss von CatSper-Blocker und Glykolsäure

Bei der Versuchsreihe von kryokonservierten Bullen-Samenproben mit 60 mM Glykolsäure und verschiedenen CatSper1-Blocker Konzentrationen konnten wir feststellen, dass der Blocker einen geringen Einfluss auf die A und B Motilität der Spermien besitzt. Nur nach direkter Zugabe konnte eine signifikante Abnahme der Motilität bei 3 µM und 10 µM Konzentration festgestellt werden (0.78 ± 0.07 * $p < 0.05$, 0.62 ± 0.13 * $p < 0.05$). Indes wird die A und B Motilität unter Glykolsäure-Einfluss nicht vom Blocker beeinträchtigt. Vergleich man die Proben mit und ohne Glykolsäure kann man feststellen, dass die Motilität über 90 min hinweg konstant hoch bleibt (1.43 ± 0.17 ** $p < 0.01$ und 1.42 ± 0.19 ** $p < 0.01$) wie im Versuch ohne Blocker. Auch hier sehen wir in der Kontrollgruppe eine konsequente Abnahme der A und B Motilität im Verlauf des Experiments (0.46 ± 0.17 Beweglichkeit nach 90 min).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

<i>Zeit (min)</i>	<i>Reagenz</i>	<i>n</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Behandelt</i>	<i>p</i>
0	3 µM Blocker	7	1	0.78 ± 0.07	
	10 µM Blocker	7	1	0.62 ± 0.13	
	3 µM Blocker + 30 mM GA	7	0.78 ± 0.07	1.43 ± 0.17	0.046
	10 µM Blocker + 30 mM GA	7	0.62 ± 0.13	1.42 ± 0.19	0.0042
30	3 µM Blocker	7	0.63 ± 0.13	0.62 ± 0.12	
	10 µM Blocker	7	0.63 ± 0.13	0.48 ± 0.17	
	3 µM Blocker + 30 mM GA	7	0.62 ± 0.12	1.25 ± 0.20	0.018
	10 µM Blocker + 30 mM GA	7	0.48 ± 0.17	1.46 ± 0.24	0.0052
60	3 µM Blocker	7	0.54 ± 0.16	0.47 ± 0.20	
	10 µM Blocker	7	0.54 ± 0.16	0.45 ± 0.21	
	3 µM Blocker + 30 mM GA	7	0.47 ± 0.20	1.14 ± 0.19	0.026
	10 µM Blocker + 30 mM GA	7	0.45 ± 0.21	1.38 ± 0.26	0.0163
90	3 µM Blocker	7	0.46 ± 0.18	0.51 ± 0.22	
	10 µM Blocker	7	0.46 ± 0.18	0.44 ± 0.21	
	3 µM Blocker + 30 mM GA	7	0.51 ± 0.22	1.15 ± 0.20	0.049
	10 µM Blocker + 30 mM GA	7	0.44 ± 0.21	1.34 ± 0.28	0.024

Tabelle 13: Statistische Auswertung der Motilität kryokonservierter boviner Samenproben mit Calcium-Kanal-Blocker und Glykolsäure

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

4.4. Einfluss von verschiedenen Zuckern im Seminalplasma (human, frisch n = 2)

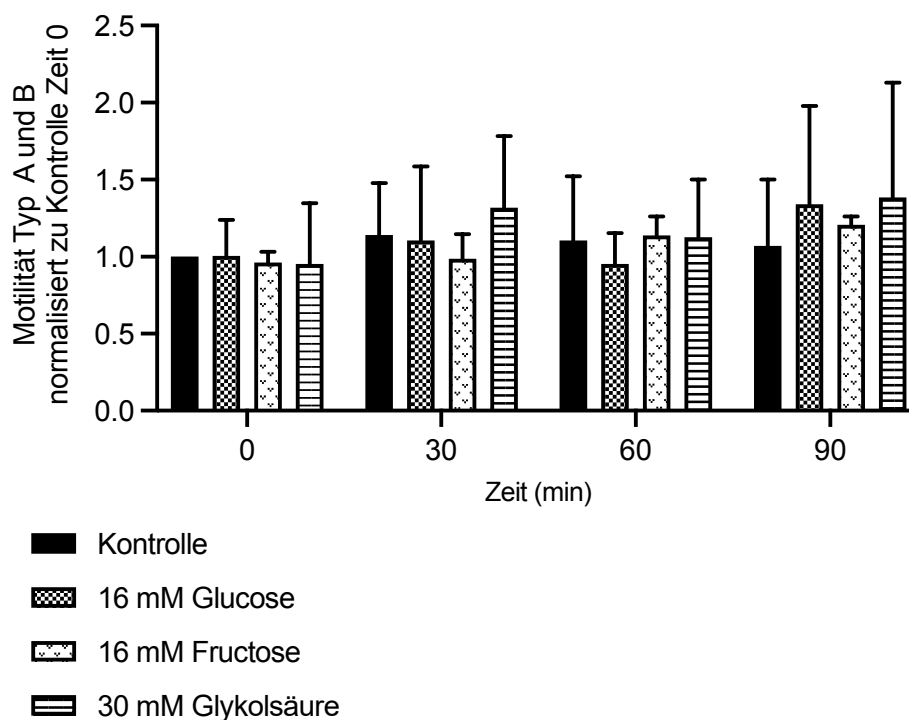


Abbildung 12: Einfluss verschiedener Zucker im Seminalplasma von humanen Samenproben auf die Motilität (n=2)

Beim Vergleich mit verschiedenen Zuckerzusätzen zum Seminalplasma unter Berücksichtigung der natürlich vorkommenden Zucker-Konzentration konnten wir keinen signifikanten Unterschied der A + B Motilität zwischen der Kontrollgruppe mit standardisiertem Puffer und den anderen Gruppen mit verschiedenen Zuckerzusätzen feststellen.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

4.5. Nachweis der Aufnahme von Kalzium in Spermien mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (Kalzium-Imaging) n = 8

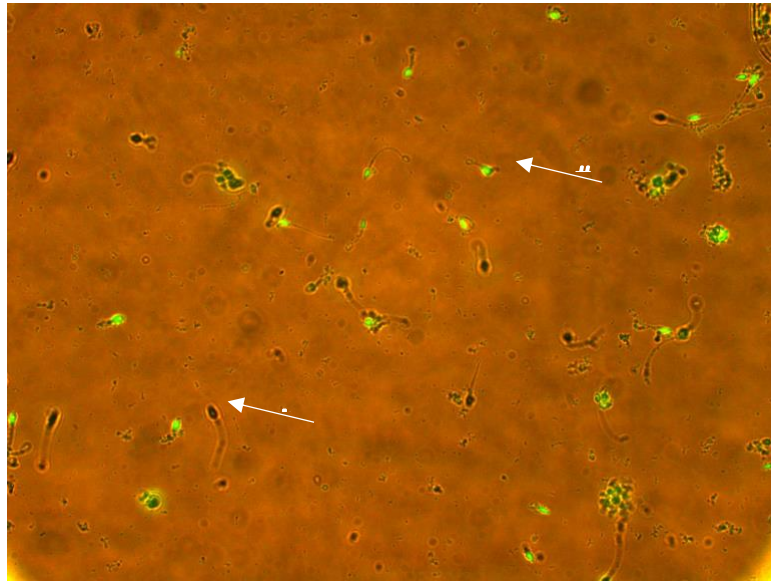


Abbildung 13: Calcium-Imaging (2 Kanal: Fluo4AM grün, 488 nm und lichtmikroskopische Aufnahme), () Spermium ohne Calcium-Aufnahme, (#) Spermium mit Calcium-Aufnahme*

Bei der Überlagerung von Lichtmikroskopischen Aufnahmen und Fluoreszenz-Kanal kann man einzelne intakte Spermatozoen gut erkennen. Ein gewisser prozentualer Anteil weist eine starke Fluoreszenz (hier in grün dargestellt bei 488 nm Laser) auf. Diese intakten (Kopf, Mittelstück und Flagellum als Kriterium) Spermatozoen wurden manuell gezählt. Eine Kontrolle ohne Fluo4AM wies keine Fluoreszenz auf.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

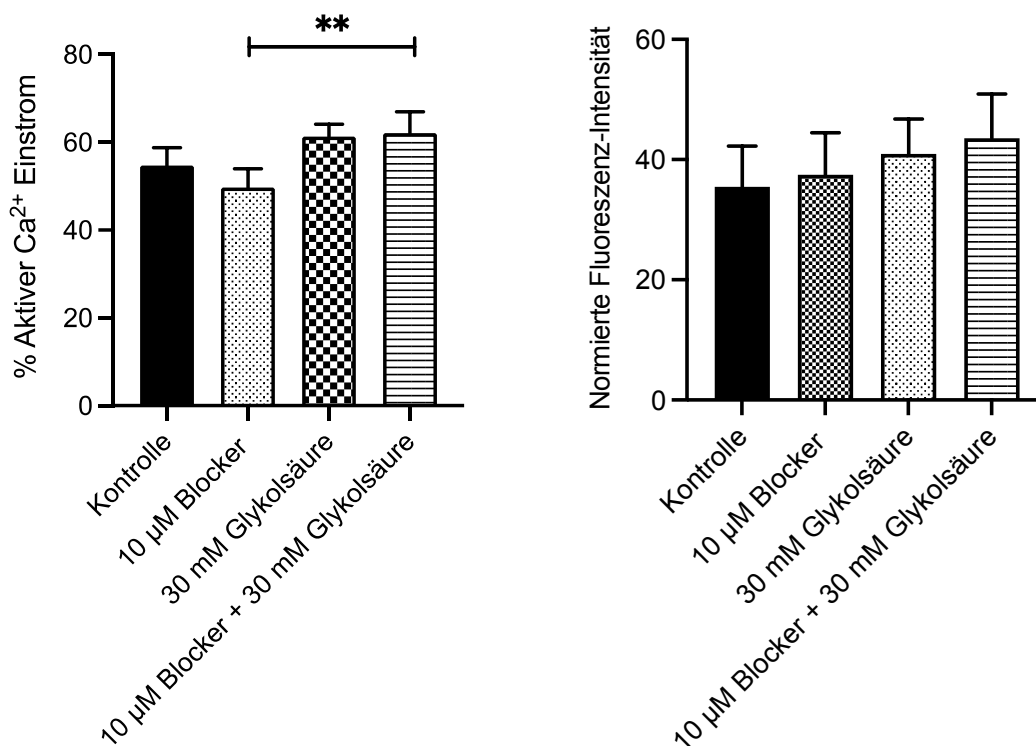


Abbildung 14: Anteil an Spermien mit aktivem Calcium-Einstrom nach Markierung mit Fluo4AM und Fluoreszenz-Intensität der Samenproben in Abhängigkeit von CatSper-Blocker und Glykolsäure

In diesem Versuch wurde der Einstrom von Ca²⁺-Ionen (Fluo4-AM markiert) in die Spermatozoen untersucht. In den Versuchsreihen wurde die Fluoreszenz-Intensität maschinell gemessen, im Anschluss daran wurden die Spermien manuell nach Fluoreszenz ausgezählt. Es konnte kein signifikanter erhöhter Einstrom von Kalzium (siehe Fluoreszenz-Intensität) durch die Zugabe eines zusätzlichen Agens gemessen werden. Die Anzahl an Spermien, welche überhaupt einen Kalzium-Einstrom hatten, wies keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und den Versuchsgruppen auf. Es konnte nur ein Unterschied zwischen der Gruppe Blocker und Blocker mit Glykolsäure beim Kalzium-Einstrom (49.7 ± 5.6 vs. 62.1 ± 6.4 % ****p < 0.01**).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

4.6. Mitochondriale Aktivität mit Glykolsäure (human)

4.6.1. Auswertung mit Flowing Software

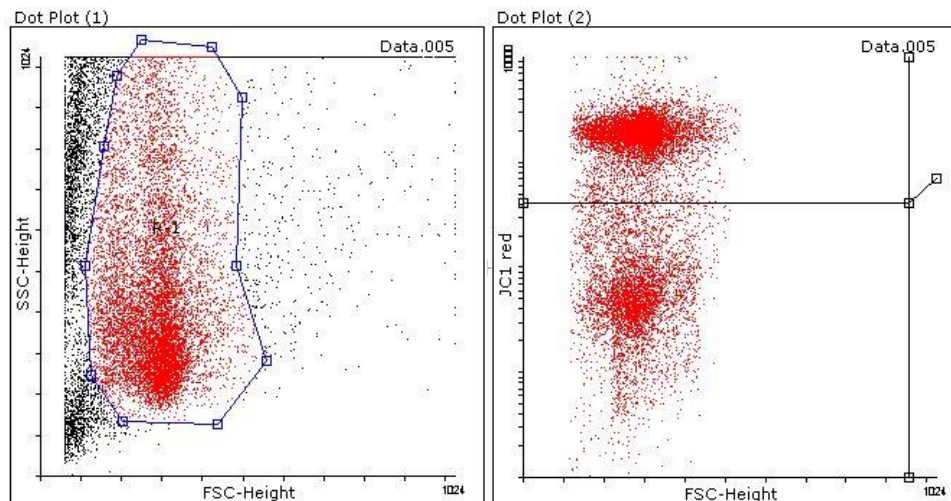


Abbildung 15: FACS-Auswertung mit Dotplot der Spermien und JC-1 red Fluoreszenz

Da nur die Fluoreszenz von intakten Spermien untersucht werden sollte, wurde die gesamte Probe zunächst nach Volumen (FSC) und Granularität (SSC) untersucht. Im Folgenden wurden dann die Zellen, deren Werte ganzer Spermatozoen entsprechen markiert und deren Fluoreszenz gemessen. Diese Population wurde dann auf Fluoreszenz (590 nm Emission) hin untersucht. Für die Kontrollgruppe wurde ein Fluoreszenz-Treshold festgesetzt. Dieser wurde als Referenz für nachfolgende Versuchsreihen verwendet. Die prozentuale Menge an Events über und unter dem Treshold wurde für die mitochondriale Fluoreszenz gezählt.

4.6.2. Mitochondriale Aktivität (n=10)

Betrachtet man die mitochondriale Aktivität der Spermatozoen, so konnten wir in unseren Experimenten keinen Anstieg der Aktivität beobachten. Man kann erkennen, dass die Anzahl der Spermien mit aktivem Mitochondrium langsam, aber stetig über die Zeit abnimmt. Zum Zeitpunkt nach 90 min haben noch ca. 70 % der Spermien ein aktives Mitochondrium (0.70 ± 0.19). Glykolsäure scheint hier keinen Einfluss zu haben.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

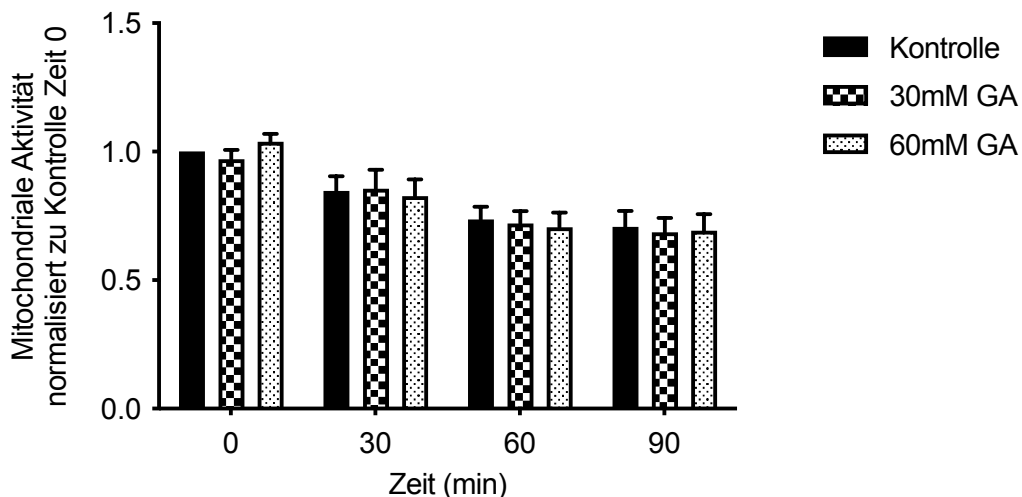


Abbildung 16: Mitochondriale Aktivität von humanen Samenproben (n=10) unter Einfluss von Glykolsäure

4.7. CatSper1-Immunhistochemie

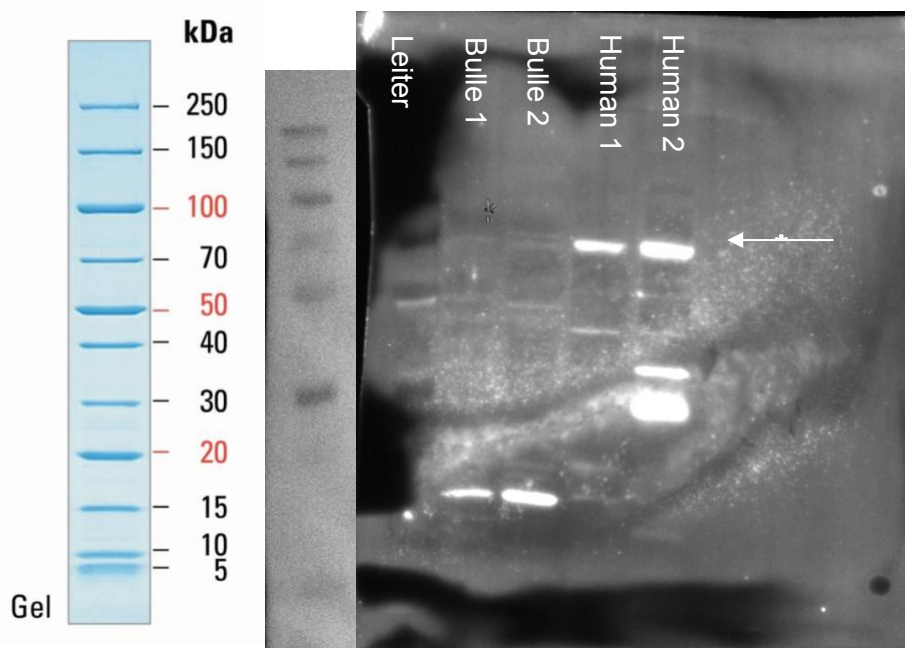


Abbildung 17: Westernblot-Membran mit ESBL markiert. Anti-CatSper1-Antikörper 1:5000, CatSper1 human (*)

Auf dem Westernblot-Gel ist zu erkennen, dass die humanen Protein-Extrakte jeweils eine Bande zwischen 70 kDa und 100 kDa zeigen. Dies würde mit dem tatsächlichen Gewicht des CatSper1 Proteins (90.1 kDa) korrelieren. Die beiden bovinen Proteinextrakte zeigen keine Banden in diesem Bereich, jedoch können Banden zwischen 5 kDa und 10 kDa in beiden Proben beobachtet werden. Bei den humanen Proben sind bei Human 2 weitere Banden im Bereich zwischen 30 kDa und 50 kDa zu erkennen.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Da der Marker im fluoreszierenden Bereich nicht richtig zu erkennen war, wurden das Fluoreszenz-Bild und ein Lichtmikroskopisches Bild überlagert, um die Größe der gewonnenen Proteinextrakte abschätzen zu können.

4.8. Zusammenhang von Samenparametern und Fertilität

In unserer untersuchten Population konnten wir sehen, dass bezüglich der Samenparameter und der Angabe des unerfüllten Kinderwunsches kein signifikanter Unterschied zwischen Männern mit Kinderwunsch und Vätern erkennbar war. Es konnten sowohl in der Vergleichsgruppe (Männer mit Kindern $n = 20$) als auch in der Studiengruppe von Männern mit Kinderwunsch ($n = 38$) pathologische Spermiogramme – also nicht den WHO-Kriterien entsprechend – gefunden werden.

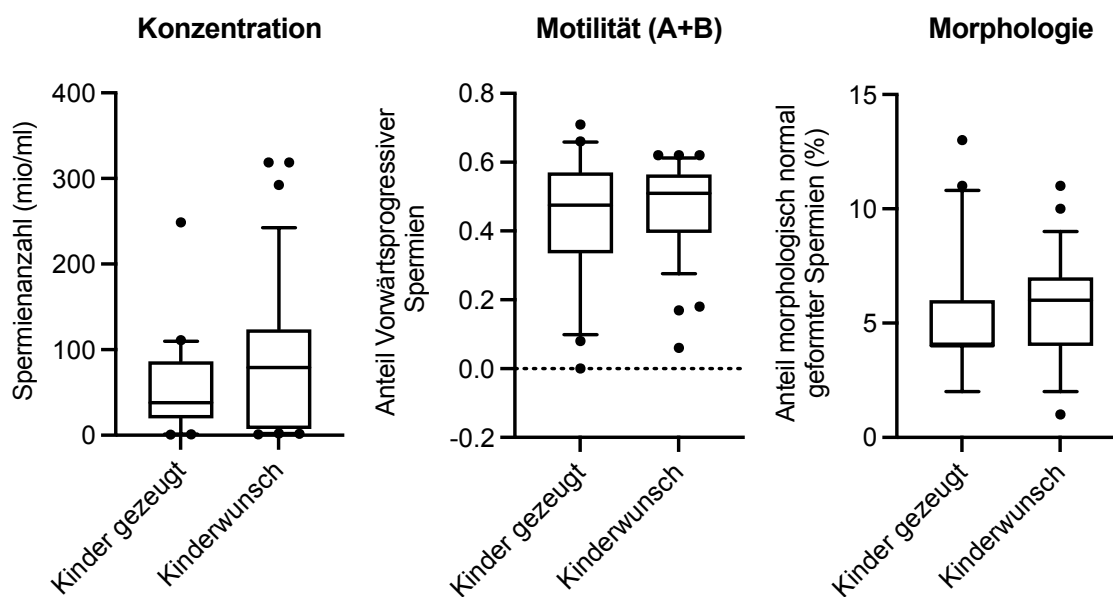


Abbildung 18: Vergleich verschiedener Parameter der Spermiogramme von Kinderwunsch-Patienten und Patienten mit eigenen Kindern

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

4.9. Färbung von Spermien mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Zuckern

Die Spermien wurden nach Ausstrich mit DAPI (hier in blau) Mitotracker DeepRed (hier in rot) und einem FITC-konjugiertem Zucker (hier in grün dargestellt) markiert. Zellen wurden 2 mal 200 in mindestens vier verschiedenen Gesichtsfeldern ausgezählt, wobei nur intakte Spermien gezählt wurden. Kontrollen ohne FITC-konjugierte Zucker wurden ebenfalls durchgeführt, um Autofluoreszenz auszuschließen. An der Studie konnten 103 Samenproben von Männern gewonnen werden. Die Tabelle mit den Studiendaten ist dem Anhang zu entnehmen.

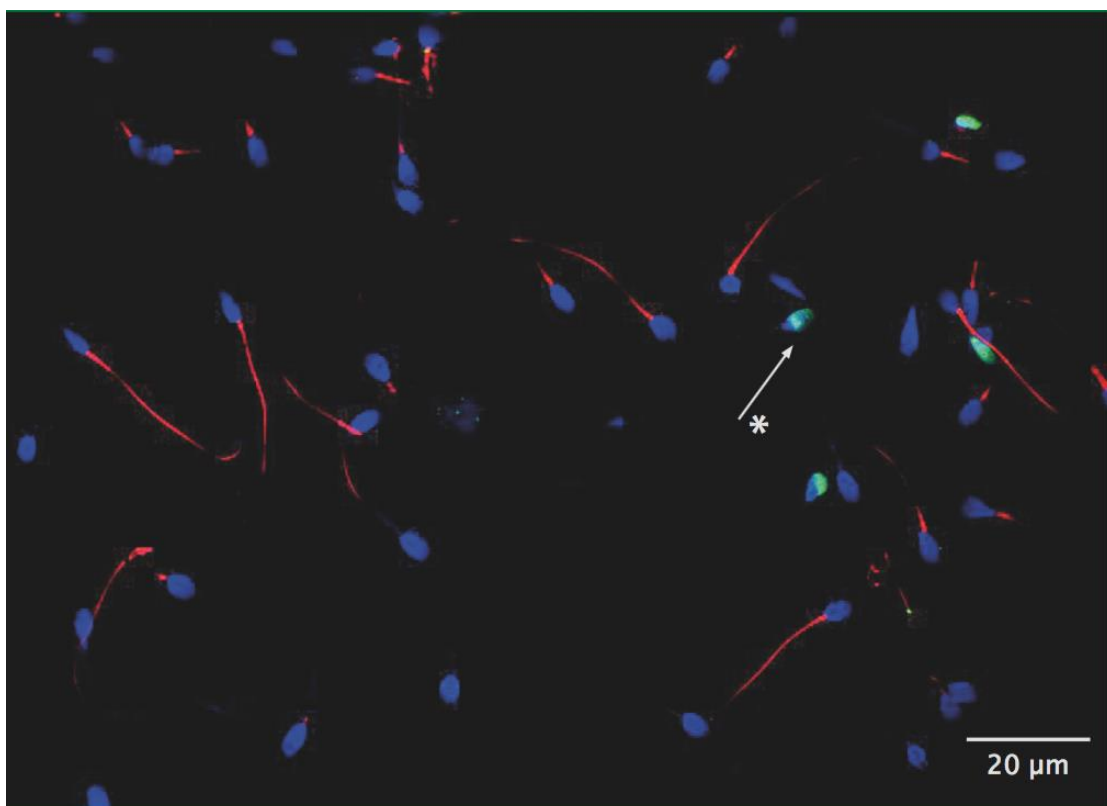


Abbildung 19: Zuckerbindung von humanen Spermien. Konfokale Laser Mikroskopie 400x. DAPI (blau), Zucker-Reste FITC-markiert (grün), Mitotracker DeepRed (rot), (*) Akrosomale Region mit Zuckerbindung

4.9.1. Oligozoospermie und Asthenozoospermie

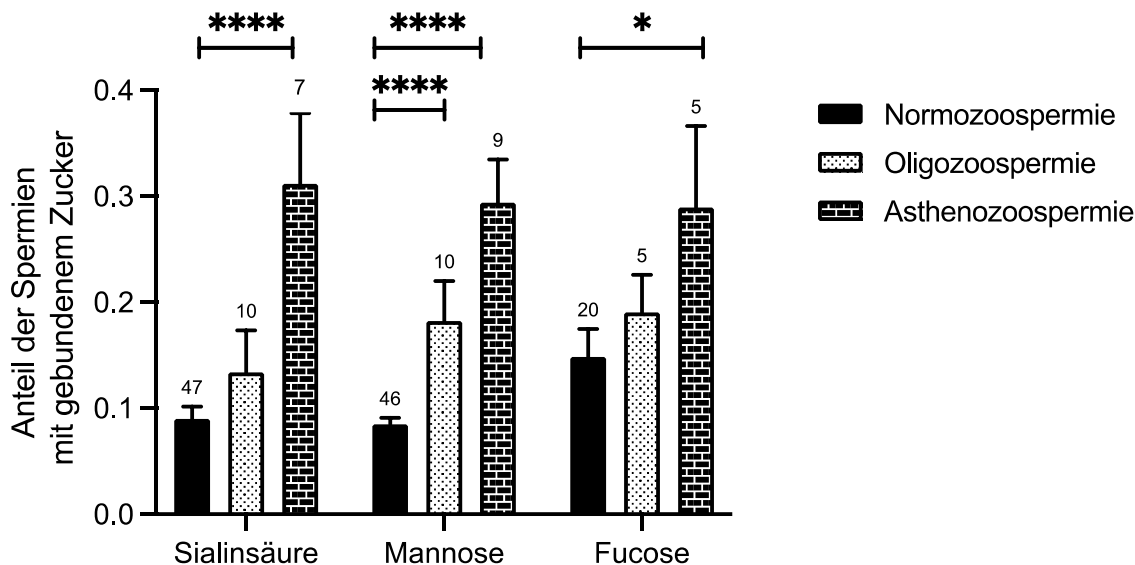


Abbildung 20: Vergleich der Zuckerbindung humaner Spermien in Abhängigkeit pathologischer Spermioogramm-Parameter

Reagenz	Normo zoospermie	n	Asthenozoospermie	n	Oligozoospermie	n	p
Sialinsäure	0.09 ± 0.01	47	0.13 ± 0.04	10			0.157
	0.09 ± 0.01	47			0.31 ± 0.07	7	<0.0001
Mannose	0.085 ± 0.01	46	0.18 ± 0.04	10			<0.0001
	0.085 ± 0.01	46			0.29 ± 0.04	9	<0.0001
Fucose	0.15 ± 0.03	20	0.19 ± 0.03	5			0.22
	0.15 ± 0.03	20			0.29 ± 0.08	5	0.014

Tabelle 14: Statistische Auswertung der Zuckerbindung in Abhängigkeit von Samenparametern

Die Anzahl der Spermien, welche Zucker gebunden hatten, variierte zwischen den einzelnen Gruppen stark. Die Zahlen über den Fehlerbalken weisen auf die Größen der Gruppen hin. Es kann ein signifikanter Anstieg der Spermien mit gebundenem Sialinsäure-Rest bei den Samenproben mit Asthenozoospermie nachgewiesen werden (0.09 ± 0.01 vs. 0.33 ± 0.06 **** $p < 0.0001$) wobei der Anstieg der gebundenen Zuckerfraktion für die Oligozoospermie-Proben nicht signifikant war.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Für die Spermienproben mit gebundener Mannose kann sowohl in der Asthenozoospermie-Gruppe (0.08 ± 0.01 vs. 0.29 ± 0.04 **** $p < 0.0001$) als auch in der Oligozoospermie-Gruppe (0.08 ± 0.01 vs. 0.18 ± 0.04 **** $p < 0.0001$) ein höherer Anteil an Spermatozoen mit gebundenem Mannose-Rest gezählt werden.

Auch die Anzahl an Spermien mit gebundenem Fucose-Rest ist in der Asthenozoospermie-Gruppe signifikant höher im Vergleich zur Normozoospermie-Gruppe (0.15 ± 0.03 vs. 0.28 ± 0.08 * $p < 0.05$).

4.9.2. Zusammenhang mit Fertilität und Kinderwunsch

Beim Vergleich der Samenproben von Männern die nachweislich schon ein Kind gezeugt hatten im Vergleich zu Proben von Männern mit Kinderwunsch zeigte sich, dass bei der Anzahl der Spermien mit gebundenem Sialinsäure-Rest (0.15 ± 0.03 vs. 0.08 ± 0.02 * $p < 0.05$) und gebundenem Mannose-Rest (0.18 ± 0.03 vs. 0.12 ± 0.2 * $p < 0.05$) ein höherer Anteil bei den Proben von Männern mit gezeugten Kindern als bei den Männern mit Kinderwunsch zu beobachten war. Bei den untersuchten Proben mit Fucose-Reste konnte kein signifikanter Anstieg beobachtet werden. Die Zahlen über den Fehlerbalken weisen auf die Anzahl untersuchter Proben in der jeweiligen Gruppe hin.

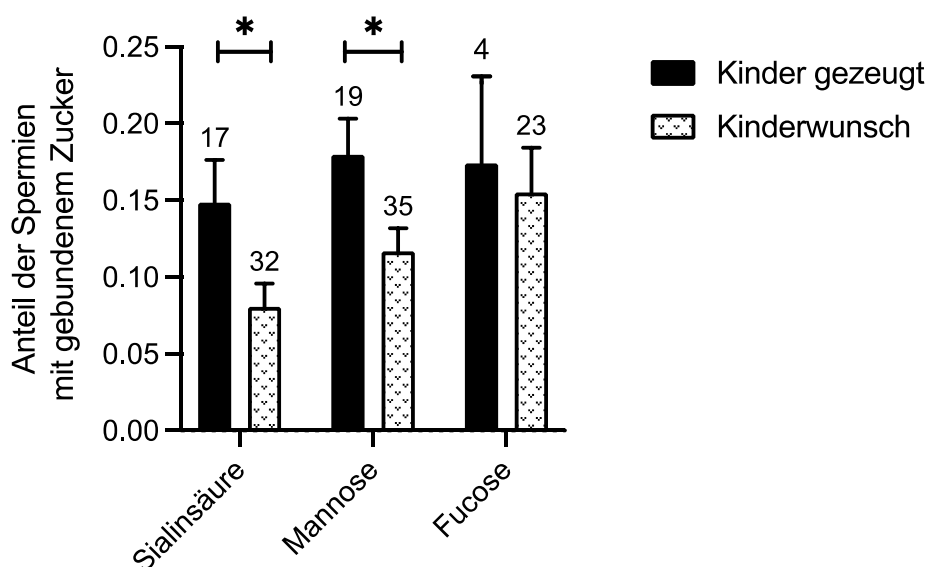


Abbildung 21: Anzahl gebundener Zucker bei humanen Spermien in Abhängigkeit von Fertilität und Kinderwunsch

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

<i>Reagenz</i>	<i>Kinder gezeugt</i>	<i>n</i>	<i>Kinderwunsch</i>	<i>n</i>	<i>p</i>
Sialinsäure	0.15 ± 0.03	17	0.08 ± 0.02	32	0.023
Mannose	0.18 ± 0.02	19	0.12 ± 0.02	35	0.022
Fucose	0.17 ± 0.06	4	0.16 ± 0.03	23	0.800

Tabelle 15: Statistische Auswertung der Zuckerbindung in Abhängigkeit von Kinderwunsch

5. Diskussion

5.1. Bedeutung der Motilität von Spermien mit und ohne Kryokonservierung für die künstliche Befruchtung

Die Kryokonservierung von Spermatozoen dient zur Erhaltung der männlichen Fertilität. Sowohl reife als auch unreife Spermien aus dem Ejakulat, operativ gewonnen aus dem Nebenhoden oder aus dem Hodengewebe können eingefroren werden, um so für eine ausreichende Zahl an vitalen Spermien zum Zeitpunkt der künstlichen Befruchtung zur Verfügung zu stehen. Abhängig von der Qualität der Spermien können diese nach dem Auftauen für verschiedene artifizielle Reproduktionstechniken zur Verfügung stehen (ART) (Nijs und Ombelet 2001). Hierfür sollte eine ausreichende Zahl an vitalen Spermien nach Auftauen ausreichend sein. Bei Parametern unter diesen Grenzwerten kann ein einzelnes kryokonserviertes Spermium auch gepickt werden, um eine ICSI zu versuchen (intrazytoplasmatische Spermien-Injektion) (Nijs und Ombelet 2000).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Motilität von humanen Spermien nach Kryokonservierung stark nachlässt (bis zu 80% der Spermien können beim Einfrieren oder Auftauen nachhaltig geschädigt werden). Dies ist auf verschiedene Einflüsse und Mechanismen zurückzuführen. Der Schaden nach Kryokonservierung ist vor allem durch den Phasenwechsel des enthaltenen Wassers beim Einfriervorgang zu erklären. Dieser Mechanismus führt zu einer osmotischen Ruptur durch intra- oder extrazelluläre Eisformationen (Tao u. a. 2020). Permeable Agenzien wie Glycerol dehydrieren die Zelle und ersetzen die Wassermoleküle. Nicht-permeable Agenzien wie Sucrose oder andere Zuckermoleküle erhöhen die Osmolarität und verhindern so Zellschäden durch Schwellung während des Dehydrierungsprozesses. Proteine, Aminosäuren und andere permeable Moleküle stabilisieren die Zellorganellen. Sie müssen beim Auftauen dann wieder entfernt werden (Nijs und Ombelet 2001). Die Lebensfähigkeit von Zellen hängt außerdem stark von der Integrität der Plasmamembran und den intrazellulär gelegenen Zellorganellen ab (Jang u. a. 2017).

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass die aufgetauten Spermienproben eine geringere Motilität aufwiesen als frisch ejakulierte Spermien (Palomar u. a. 2018). In weiteren Studien wurde diese Beobachtung bestätigt. Es zeigte sich eine Verringerung der Motilität zwischen 25-75%, sowohl in Proben von normozoospermen Patienten als auch bei Männern mit leicht bis schwer ausgeprägtem OAT Syndrom (Esteves u. a. 2000; Hammadeh u. a. 1999). Andere Studien belegen, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit von Gefrierschäden und der Qualität der Samenprobe besteht. Zudem wird vermutet, dass

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

epididymale und testikuläre Spermien anfälliger für Schäden durch den Prozess der Kryokonservierung sind, als frisch ejakulierte Spermatozoen (Nijs und Ombelet 2000).

Ein Faktor, welcher die Motilitätsraten bei der Präparation und Kryokonservierung von humanen Spermatozoen erhöht, ist das Swim-Up Prozedere. Wie bei den Versuchen für die Aufnahme von Kalzium mittels Kalzium Imaging werden hierbei Spermienproben für eine gewisse Zeit (ca. 30 min) stehen gelassen, um dann in den oberen zwei Dritteln der Probe motile Spermien zu gewinnen. Studien zeigen, dass die Qualität und vor allem die Motilität von Spermienproben zunimmt, wenn diese vor dem Einfrieren einer Swim-Up Prozedur unterzogen wurden (Petyim u. a. 2014; Esteves u. a. 2000).

Die Kryokonservierung von Spermatozoen wird als die wirkungsvollste Methode zum Fertilitätserhalt angesehen. Vor allem für Männer die sich einer fertilitätstoxischen Therapie (wie z. B. einer Chemotherapie) unterziehen müssen, Männern mit einem schweren OAT-Syndrom oder bei Vorliegen einer Ejakulationsstörung (Tao u. a. 2020) ist eine Kryokonservierung essentiell.

5.2. Bedeutung der Motilität von Spermien nach Kryokonservierung bei der Tierzucht im Vergleich zu humaner Spermienqualität

In den vorliegenden Versuchen konnte ich zeigen, dass sich humane Spermien nicht mit bovinen oder porcinen Spermien vergleichen lassen. Die Indikation für die Kryokonservierung von Spermien weicht beim Menschen stark von der im Tierreich ab. Bei den Rindern und Schweinen werden die Ejakulate vor allem zu kommerziellen Zwecken wie der effizienten Selektion von Spermien für Zuchtprogramme eingesetzt (Tao u. a. 2020). Somit werden in der Regel qualitativ hochwertige Spermien kryokonserviert. Der Grund hierfür ist vor allem, dass Rinder und Schweine, deren Samenproben nicht ausreichend Qualität besitzen, zur Zucht ausgeschlossen werden und so nur die „potentesten“ Bullen und Eber für Nachkommen zum Einsatz kommen. Dies ist in der Humanmedizin anders. In der Regel liegen beim Kinderwunschpatienten eingeschränkte Qualitäten vor, eine Schwangerschaft wurde bis zum Einfrieren meist nicht erreicht.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass humane Spermien bei weitem nicht die Werte für Motilität, Morphologie und Anzahl erreichen, wie Spermatozoen in bovinen oder porcinen Proben. Dies war sowohl bei den frischen Proben als auch bei den kryokonservierten der Fall. In den letzten 70 Jahren hat die Samenqualität in Bezug auf Anzahl, Motilität und Morphologie der Spermien selbst in fertilen Männern stark abgenommen (Cooper u. a. 2010). Gründe

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

hierfür sind vielfältig und werden unter anderem auf spezifische chronische Erkrankungen (Lehtihet und Hylander 2015; La Vignera u. a. 2012) zurückgeführt. Auch Änderungen des Lebensstils wie Rauchen (Harlev u. a. 2015), Alkohol (Muthusami und Chinnaswamy 2005), Fettleibigkeit (MacDonald u. a. 2010), sozialer Stress (Gollenberg u. a. 2010), Kontakt mit polyzyklischen aromatischen Carbonsäuren oder Schwermetallen, zusammen mit einer Zunahme von Umweltschäden/Luftverschmutzung (Deng u. a. 2016) könnten Gründe für eine sinkende Anzahl und Beweglichkeit von Spermien sein.

5.2.1. Allgemeine Motilitätsbestimmung humaner, boviner und porciner Spermien

In unseren Experimenten mit Samenproben verschiedener Spezies konnten wir feststellen, wie unterschiedlich die einzelnen Proben und wie speziesspezifisch die Motilität war. Da in unseren Versuchen die Motilität die wichtigste Rolle spielte, wurden Parameter wie Morphologie und Vitalität, sowie durchschnittliche Anzahl von Spermien nicht berücksichtigt. Die allgemeine Motilität der frischen humanen Proben wiesen im Schnitt eine deutlich geringere Motilität auf als noch im andrologischen Labor gezählt (Einschränkungen der Motilität um bis zu 10%). Ein Grund hierfür könnte der Transport ins Labor sein. Auch die Studienpopulation könnte hier eine Rolle spielen. Es wurden alle Männer in die Studie mit eingeschlossen die keine Azoospermie aufwiesen. Viele dieser Patienten kamen unter anderem wegen ungeklärter Kinderlosigkeit in die Klinik. Deshalb waren zahlreiche Ejakulate mit der Diagnose Asthenozoospermie oder Oligozoospermie vorhanden. Guzik u. a. (2001) fanden, dass eingeschränkte Motilität und idiopathische Infertilität in Zusammenhang gebracht werden können. In einer Studie zum „total motility count“ (Hamilton u. a. 2015) wurde nahegelegt, dass die Motilitätszählung der Samenproben sogar besser geeignet wäre um die Fertilität eines Ejakulats abzuschätzen als die WHO-Parameter.

In den hier vorliegenden Versuchsreihen konnte zudem ein Abfall der Motilität nach Auftauen der Ejakulate festgestellt werden. Dieses Phänomen deckt sich mit der Literatur in der ein Abfall der Motilität zwischen 25-75 % nach Kryokonservierung beschrieben wird (Nijs und Ombelet 2001). Dieser Effekt wird auf die schwierigen osmotischen Verhältnisse beim Einfrieren und Auftauen zurückgeführt. Obwohl Spermatozoen in der Lage sind auf eine Schrumpfung bis auf 75 % und Schwellung bis auf 110 % ihres Volumens auszuhalten (Gao u. a. 1995), werden kryoprotektive Agenzien mit niedriger molekularer Masse eingesetzt um die Masse an Eiskristallen, welche sich intrazellulär formen können, zu reduzieren (Nijs und Ombelet 2001).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Bovine Samenproben weisen im Gegensatz zu humanen Ejakulaten eine weitaus größere Motilität und morphologische Kongruenz nach dem Auftauen auf. Dies liegt vor allem daran, dass die Ejakulate von Nutztieren im Gegensatz zu humanen Ejakulaten schon seit Jahrzehnten für die kommerzielle Verwendung von Kryo-Speichern für eine effiziente Selektierung für Zuchtprogramme verwendet werden (Nijs und Ombelet 2000) und so die Qualität der Samen konsequent auf einem hohen Niveau gehalten wurde. Die Kryokonservierung in der Tierzucht von Rindern fördert nicht nur die Konservierung von selteneren genetischen Varianten, sondern macht es auch möglich, eine beschleunigte genetische Auslese und Optimierung einzelner Zuchtlinien zu fördern (Grötter u. a. 2019). Trotz dessen werden auch hier massive qualitative Einbußen durch das Einfrieren hingenommen. Der Schaden, welcher an der Plasmamembran durch das Einfrieren entsteht, löst einen Domino-Effekt auf andere zelluläre Strukturen und Funktionen aus (Grötter u. a. 2019). So wird die Induktion einer unreifen akrosomalen Reaktion, die Veränderung der mitochondrialen Funktion, die Reduktion der Motilität und Chromatin Kondensations-Fehler für die Abnahme von Lebensfähigkeit und Fertilität verantwortlich gemacht (Holt 2000; Watson 2000).

Die Ergebnisse der porcinen Motilitätsbestimmung waren in unseren Versuchen nur eingeschränkt aussagekräftig, da im Rahmen dieser Arbeit nur zweimal die Möglichkeit bestand, frische Proben auf einem Versuchsgut zu bekommen. Insgesamt konnte die Beobachtung gemacht werden, dass porcine Spermien genauso wie bei den bovinen Ejakulaten, eine weitaus größere Homogenität der Spermatozoen aufwiesen. Die Gründe hierfür sind die gleichen wie bereits oben angeführt. Diese liegen vor allem in der Zucht zu kommerziellen Zwecken. Porcine Ejakulate werden heute entweder kryokonserviert oder flüssig gelagert (Fang u. a. 2017) um den Einsatz in der Zucht zu erleichtern.

5.2.2. Bedeutung der Motilität unter Einfluss verschiedener Agenzien

5.2.3. Glykolsäure (Hydroxyessigsäure)

Die Zugabe von Glykolsäure in verschiedenen Konzentrationen (30 und 60 mM) bewirkte eine signifikante Steigerung der Motilität von frischen humanen Spermien direkt nach Zugabe bis zu 60 min nach Inkubation um 26%. Dieser Effekt wurde bei 60 mM Glykolsäure mit bis zu 32% Motilitätssteigerung noch deutlicher als bei 30 mM.

Um eine Qualitäts-Kontrolle zu gewährleisten, wurden Kontrollen mit normalem Puffer ohne Zusatz verwendet. Hier war es wichtig, dass die Motilitätskontrollen zeitabhängig abfielen und

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

ein kongruentes Verhalten zwischen allen durchgeführten Versuchsreihen zeigten. Es konnte in den humanen Proben eine leichte Erhöhung der A- und B-Motilität um 30% nachgewiesen werden nach 30 min Inkubation mit dem Puffer (Differenz 0.47 ± 0.10 *** $p < 0.001$). Dieser Effekt könnte auch eine Anpassung der Spermatozoen auf die Bedingungen (osmotischer Druck, Nährstoffangebot und pH) zurückzuführen sein. Freitas u.a. (2017) postulierten nach Analyse zahlreicher Studien zwei verschiedene Wege – ATP-abhängige Aktivierung von Dynein im Flagellum und Glykolyse im Mitochondrium – welche die Motilität von Spermien sichern sollen. Die Anpassung an diese zwei Bedingungen könnte die verbesserte Motilität erklären. Erwartungsgemäß sank die progressive Motilität der Samenproben ab 60 min ab. Ab dieser Zeit besteht eventuell ein eingeschränktes Nährstoffangebot oder die ATP-Reserven von einigen Spermatozoen waren schon aufgebraucht (Piomboni u. a. 2012).

Die Zunahme der Motilität der Proben mit Glykolsäure durch eine pH-Senkung kann hier ausgeschlossen werden. Alle Experimente wurden unter pH-Wert Kontrolle durchgeführt und ein pH zwischen 7.2 und 7.4 sichergestellt. Zhou u. a. (2015) zeigten, dass der pH-Wert im Seminalplasma sich signifikant auf die Motilität, Vitalität und den Ca^{2+} -Haushalt von humanen Spermien auswirkt. Hyperaktivierung von membranlosen Spermatozoen braucht einen pH von 7.9 bis 8.5, wohingegen die normale aktivierte Motilität schon bei pH 7.0 stattfindet (S. S. Suarez und Ho 2003). Es wurde vermutet, dass der zytoplasmatische pH das axonale Kompartiment bei der Hyperaktivierung von intakten Spermien stärkt (Ho u.a. 2002).

In dieser Studie konnte ein negativer Zusammenhang zwischen der pH-Senkung und der Motilität nachgewiesen werden. In unserem Experiment zeigte die leichte pH-Senkung durch die Glykolsäure keinen negativen Effekt auf die Motilität. Diesen Effekt konnten wir auch bei Vorversuchen mit höheren Glykolsäure-Konzentrationen (ab 100 mM) beobachten.

Der Anstieg der progressiven Beweglichkeit könnte möglicherweise durch einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom bedingt sein, die eine verfrühte Hyperreaktion mit Hypermobilisation mit sich ziehen. Hyperaktivierung von Säugetier-Spermien wird als Veränderung von einer aktiven Flagellum-Bewegung (hohe Frequenz, geringe Amplitude, progressive Beweglichkeit) hin zu einer Hyperaktivierung hin, bei der die Bewegung des Flagellums asymmetrisch wird und die Frequenz sichtlich abnimmt. Auf diese Möglichkeit wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

Glykolsäure wurde in der Medizin bisher nur in der Dermatologie zur Behandlung von Akne (Valle-González u. a. 2020) und als Anti-Aging Produkt (Kim und Won 1998) verwendet. Zudem könnten andere Studien auf eine neuroprotektive Funktion hinweisen (Pan-Montojo u.a. nicht publiziert).

Interessanterweise konnten weitere Studien ähnliche Glykolsäure-Konzentrationen von 12.5 mM bis 50 mM als optimale Konzentrationen feststellen. Die Ergebnisse dieser Studien mit

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Fibroblasten konnten erhöhte Zellproliferation und Kollagen-Produktion als Antwort auf Glykolsäure-Zugabe liefern. Dieser Effekt war auch konzentrationsabhängig (Kim und Won 1998). Ein denkbarer Effekt auf Spermien wäre demzufolge, ein erhöhter Stoffwechselumsatz, da im Spermium keine Stoffe synthetisiert werden.

Betrachtet man die Ergebnisse des Einflusses von Glykolsäure auf kryokonservierte humane Spermien, so kann man zwar keine signifikante Steigerung der A- und B-Motilität beobachten. Allerdings weist der Trend darauf hin, dass mit einer größeren Probanden-Zahl hier auch eine signifikante Steigerung der A- und B-Motilität direkt nach Zugabe mit 60 mM Glykolsäure erreicht werden könnte ($p=0.056$). Der geringere Einfluss des Agens auf die Proben könnte vielfältige Gründe haben. Am wahrscheinlichsten ist der geringe Einfluss durch Vorschädigung der meisten Spermatozoen durch das Einfrieren und Auftauen. Durch die Schädigung könnte auch der Einfluss von stoffwechselaktivierenden Stoffen vermindert sein. Holt und Watson (2000) wiesen schon auf die eingeschränkte mitochondriale Aktivität und unreife Akrosom-Reaktion durch die Kryokonservierung hin. Auch der Schaden an der Plasmamembran (Grötter u. a. 2019) könnte hierfür verantwortlich gemacht werden.

Besonders eindrucksvoll war der Effekt von Glykolsäure auf die Motilität von bovinen Spermien. Hier konnte für alle Konzentrationen eine signifikante Zunahme der vorwärts progressiven Beweglichkeit gezeigt werden. Während in die Kontrollgruppe die Vorwärts-Beweglichkeit kontinuierlich über die Zeit abnahm (0.44 ± 0.05 nach 90 min) konnte die Versuchsreihe mit 30 und 60 mM Glykolsäure eine Vorwärtsbeweglichkeit sogar auf dem Level der Kontrollgruppe von Beginn nach 90 min halten (1.06 ± 0.11 für 60 mM und 1.02 ± 0.07 für 30 mM Glykolsäure). Warum der Effekt auf bovine Spermien viel größer war, als auf humane Spermien könnte an der Homogenität der zur Zucht ausgewählten genetisch geeigneten Bullen sein, während die humanen Proben größtenteils von Männern gewonnen wurden, die zur Abklärung der Fertilität in die Klinik kamen. Es ist davon auszugehen, dass sowohl die Integrität als auch die Funktionalität der bovinen Spermien von Anfang an besser war und sie demnach besser (bzw. gleichförmiger) auf Agenzien ansprechen. Leider gibt es bisher keine Studien, die den direkten Vergleich von bovinen und humanen Schäden nach Kryokonservierung vergleichen.

Für die porcinen Versuche konnte leider kein Trend bezüglich der Wirkung von Glykolsäure auf die Motilität festgestellt werden. Der Grund hierfür lag sicherlich in der begrenzten Anzahl der Versuche ($n=2$), sowie als auch am Verhalten der Spermatozoen mit den gewohnten Glykolsäure-Konzentrationen. Bei 60 mM konnten überhaupt keine vitalen porcinen Spermien mehr beobachtet werden, der Grund hierfür könnte ein verändertes Aufnahmemuster oder eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem pH sein.

5.2.4. CatSper1-Blocker und Glykolsäure

Mit der Frage nach dem Aufnahmemechanismus führten wir zusätzliche Versuche mit dem Calcium²⁺-Kanal Blocker NNC 55-0396 durch. Die Frage war, ob Glykolsäure als kleines Molekül eventuell mit Ca²⁺ durch entsprechende Kanäle (CatSper1) in das Spermium aufgenommen wird.

Unsere Versuche zeigten, dass bei Zugabe von 10 µM Blocker eine signifikante Abnahme der A- und B-Motilität zu beobachten ist. Strünker u. a. (2011) konnten bei Versuchen mit humanen Spermien einen eingeschränkten Ca²⁺-Einstrom durch den oben genannten Blocker und infolgedessen eine reduzierte Motilität bei humanen Spermien feststellen. Auch Vicente-Carrillo u.a. (2017) fanden eine reduzierte Motilität bei porcinen Spermien unter Einsatz dieses CatSper-Blockers. Die Reduktion der Motilität setzt in meinen Experimenten direkt nach Zugabe ein und hält sich bis Versuchsende konstant auf niedrigem Niveau. Dieser Effekt ist dosis-abhängig zu den Zeitpunkten 0,30 und 60 min (*p=0.027, *p=0.013, *p=0.019).

Die Wirkung von Glykolsäure zusammen mit dem CatSper1-Blocker NNC 55-0396 zeigte keine signifikante Verschlechterung der Vorwärts-Progression der humanen und der bovinen Spermien. (p-Werte siehe Tabelle). Es konnte wie im vorherigen Versuch kein signifikanter Anstieg der progressiv beweglichen Spermien festgestellt werden. Sollte die Glykolsäure über ähnliche Strukturen wie die Ca²⁺-Ionen in das Spermium gelangen, wäre nach Zugabe von Glykolsäure ein Einbruch der Motilität zu erwarten. Bei Bullenspermien konnten wir noch eine signifikante Steigerung der Glykolsäure-Reihe gegenüber den Blocker-Gruppen und der Kontrollgruppe um bis zu 90 % feststellen (siehe Tabelle). Auch in einem anderen Experiment hierzu kann in der Literatur der CatSper-Blocker Mibefradil die Hyperaktivität von bovinen Spermien signifikant senken (Johnson u. a. 2017). In diesem Experiment wurde gezeigt, dass Koffein einen stark positiven Effekt auf die Hypermobilisierung von bovinen Spermien - unabhängig vom CatSper-Blocker - hat.

Calcium-Ionen und deren Mobilisierung werden mit als treibende Kraft für die Hyperaktivierung der Spermien angesehen. Die Frage hierbei ist, wie das Calcium in die Zelle gelangt und wie es reguliert wird (Publicover u. a. 2008). Die Ca²⁺-Kanäle und Ca²⁺-Speicher spielen hierbei eine wichtige Rolle für die Mobilisierung der Spermien. Einer dieser Kanäle wurde 2001 entdeckt und als CatSper-Channel klassifiziert (Ren u. a. 2001). In humanen Spermien wird der CatSper-Kanal durch intrazelluläre Alkalinisierung und durch Progesteron (Lishko u. a. 2012) aktiviert.

5.2.5. Verschiedene Zuckerarten im Seminalplasma

In unseren Versuchen konnten wir beobachten, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Motilität zwischen den einzelnen Versuchsgruppen mit Glucose, Fructose und Glykolsäure gab. Kritisch ist hierbei anzumerken, dass für die Versuche leider nur zwei Probanden untersucht wurden. Dennoch weisen die geringen Unterschiede in der Motilität möglicherweise darauf hin, dass Glykolsäure über einen ähnlichen oder gleichen Mechanismus in das Spermium gelangt wie die anderen aufgenommenen Zucker. Spermien brauchen nach der Ejakulation eine externe Quelle von Hexosen, da sie nach Reifung das meiste ihres Zytoplasmas verloren haben und den wenigen verbliebenen Platz für die Generierung von Energie benötigen. Obwohl humane Spermien auch in Medien ohne an der Glykolyse beteiligte Zucker motil bleiben können, ist es unklar, ob so eine Beweglichkeit ausreichen würde, um Spermien über einen langen Zeitraum hinweg befruchtungsfähig zu halten (Ford und Harrison 1981).

Die verschiedenen Hexosen brauchen die Spermien wie Treibstoff und er kann aus Glucose, Mannose, Fructose oder auch Laktat oder Citrat bestehen (Ford und Harrison 1981). Fucose wurde in dieser Studie nicht untersucht. Auch Pyruvat in hohen Konzentrationen wird als Quelle von Säugetier-Spermatozoen zur Energiegewinnung genutzt. Laktat und Citrat sind wie Glykolsäure organische Säuren, was zudem nahelegt, dass der Stoff wie die anderen Hexosen aufgenommen wird.

In einem Review resümierten du Plessis u. a. (2015), dass es zwei wichtige Stoffwechselwege gibt, wie Spermien Energie für die Bewegung generieren. Einerseits wird die Energie durch Glykolyse, mitochondriale Atmung oder als Kombination aus beiden bereit gestellt (du Plessis u. a. 2015). Beide Wege werden als essenziell für die humane Spermienfunktion und die erfolgreiche Befruchtung angesehen. Die Aufnahme von Zucker wird durch die Hexose-Transporter GLUT 1,2,3 und 5 im humanen Spermium reguliert. Angulo u. a. (1998) fanden als erste heraus, dass in humanen, bovine und Ratten-Spermien GLUTs exprimiert und funktionell wichtig sind. Diese Studie beschäftigte sich vor allem mit der Zuckeraufnahme und der deren Hemmung sowie daraus resultierenden Folgenden für den Spermien-Metabolismus. So wurden GLUT1 und GLUT2 in der akrosomalen Region und im Haupt- und Endstück des Flagellums gefunden. Auch weil die verschiedenen Isoformen der GLU-Transporter eine jeweils andere Lokalisation aufweisen wird vermutet, dass sie so für verschiedene metabolische Strategien zur Energieversorgung zur Verfügung stehen (Bucci u. a. 2011).

Einige andere Studien belegten zudem verschiedene Kontroll-Mechanismen der Aufnahme von Zucker-Derivaten oder anderen Stoffen gefunden, deren Rolle glykolytische und an der

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

oxidativen Phosphorylierung beteiligte Enzyme zugeschrieben werden (Marin u. a. 2003; Rodriguez-Gil 2006). Diese Transporter (GLUTs) werden auch als Schlüsselrolle in diesem Regulationsprozess angesehen weil sie den Substrat Einstrom in die Spermien-Zelle regulieren können (Rodriguez-Gil 2006).

Unsere Experimente zeigen zudem, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Zuckern Glucose und Fructose hinsichtlich der Vorwärts-Progressiven Beweglichkeit von Spermien besteht. Dies würde bedeuten, dass sowohl Glucose als auch Fructose in gleicher Weise für die Energiegewinnung genutzt werden. Eine große Anzahl von Studien belegte den Nutzen von Glucose und anderen Zuckern für die Aufrechterhaltung der Motilität. So konnten Rogers und Perreault (1990) zeigen, dass signifikant mehr humane Spermien in Präsenz von Glucose fähig waren eine Zona-freie Hamster Oozyte zu befruchten als mit Fructose, Mannose oder Galactose. Williams und Ford (2001) zeigten, dass bei Inkubation mit diesen drei Zuckern Glucose und Fructose die Motilität von Spermatozoen steigern, während Galactose dies nicht tat. Allerdings wurde in diesem Experiment nur die allgemeine Anzahl motiler Spermien gezählt und nicht explizit die Vorwärts-Beweglichkeit betrachtet. Andere Versuche mit Glucose, Pyruvat und Lactose bei Mäusespermien konnten keinen Unterschied zwischen diesen Substanzen feststellen. Zudem wurde gezeigt, dass die Glykolyse der wichtigste Faktor dort zur Energiegewinnung ist (Mukai und Okuno 2004). Es konnten schon in den 1940er Jahren Versuche gemacht werden, bei denen in Mäuse-Spermien Glykolyse und in Bullen-Spermien Oxidative Phosphorylierung als der dominante Weg zur Energiegewinnung genannt werden (Lardy und Phillips 1943). Es wurde auch gezeigt, dass bei Bullen der dominante Weg der Energiegewinnung auf der oxidativen Phosphorylierung im mitochondrialen Teil der Spermien beruht. Der Grund hierfür wird in der schlechten Verfügbarkeit von Hexosen im weiblichen bovinen Oviduct gesehen. Infolgedessen sind bovine Spermien auf die Energie-Generierung in den Mitochondrien angewiesen (Storey 2004).

5.3. Allgemeine Bedeutung von Motilität und anderen Parametern in der Andrologie

In unserer Studienpopulation konnten wir beobachten, dass die Samenparameter, Konzentration, Vorwärts-Progression und Morphologie nicht immer mit der Fähigkeit Kinder zu zeugen in direktem Zusammenhang stehen. Zwischen den Studienpopulationen mit Kinderwunsch und Männern mit eigenen Kindern konnte kein signifikanter Unterschied in den erhobenen Messdaten statistisch evaluiert werden. Dieser fehlende Zusammenhang zwischen abnormalen Samenparametern und möglichen anderen Evaluationsmöglichkeiten der Fertilität wird im Folgenden diskutiert werden.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Die Infertilität von Männern ist eine wichtige Diagnose und häufig Ursache von ungewollter Kinderlosigkeit (Ma u. a. 2012). Die Diagnostik stützt sich hierbei auf die Ergebnisse der Samen-Analyse. Die WHO hat hierbei Grenzwerte festgesetzt, die festlegen, ob ein Mann fertil ist oder nicht. Diese beziehen sich vor allem aber auch auf Paaranalysen und ungewollte Kinderlosigkeit nach einem Jahr regelmäßigen Geschlechtsverkehrs. 2010 und 2021 wurden diese Werte nach WHO aktualisiert, da frühere Werte auf einer Durchschnittspopulation des Jahres 1953 basierten. Damals wurde festgelegt, dass Männer die kürzlich Vater wurden oder deren Frau innerhalb eines Jahres schwanger geworden war, zur Befruchtung fähig sind. Die Studienpopulation wurde hierzu mit Männern aus der ganzen Welt zusammengestellt. Samenproben, deren Werte bezüglich Konzentration, Beweglichkeit und Morphologie unter der 5 %-Perzentile liegen, werden als abnormal angesehen (WHO, 2010).

Idealerweise wird ein medizinisches Klassifikations-System in Zusammenhang mit dem klinischen Outcome gebracht. Im Fall von männlicher Infertilität stützt sich die Diagnose auf spontane Schwangerschaftsraten oder die Schwangerschaftsrate nach künstlicher Befruchtung (Hamilton u. a. 2015). Nur wenige Studien haben den prädiktiven Wert der WHO Kriterien nachgewiesen. So fanden Polansky und Lamb 1988 keine signifikante Korrelation von Samen-Parametern und der Wahrscheinlichkeit der Konzeption. In dieser Studie wurden 1089 Paare untersucht und deren Schwangerschaften ins Verhältnis zu den Parametern der Samenanalysen gebracht. Es konnte kein signifikanter Unterschied bei den kinderlosen Paaren und erfolgreicher Schwangerschaft bezüglich der Samenparameter festgestellt werden. Daraus folgerten die Autoren, dass Samenparameter allein nicht zur Vorhersage einer Fertilität geeignet sind (Polansky und Lamb 1988). Auch eine 2007 durchgeführte Studie verglich mehrere Prädiktions-Modelle für eine Schwangerschaft und versuchte die WHO-Kriterien von 1999 zu validieren. Das Ergebnis war, dass der prädiktive Wert der WHO-Werte relativ gering ausfiel (van der Steeg u. a. 2007). Insgesamt betrachtet muss man sagen, dass die Grenzwerte der WHO zwar eine gewisse Bedeutung in der andrologischen Diagnostik aufweisen, jedoch Vorhersagen zu eventuellen Schwangerschaftsraten nur unzuverlässig getroffen werden können.

Obwohl in der Andrologie mittlerweile viele verschiedene Marker eingesetzt werden, um die Qualität des Spermprobe zu beurteilen, ist und bleibt die Zählung der Spermien einer der aussagekräftigsten Faktoren. Unter dem Aspekt der Motilität und der darauf aufbauenden Aussage zur Vitalität ist die Beurteilung der Spermien auch in Hinblick auf das Outcome nach Kryokonservierung der entscheidende Faktor, um zu entscheiden, ob Spermien nach dem Auftauen noch befruchtungsfähig sind. (Palomar Rios u. a. 2018) Die Relevanz der Auszählung von Spermien nach Motilität wird auch in vielen weiteren Studien zur Kryokonservierung bei Patienten mit Hodenkrebs (Hotaling u. a. 2016) oder zur

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Fertilitätsabklärung (Hamilton u. a. 2015) hervorgehoben. Die Auszählung der Gesamt-Motilität von Spermien ist auch in Hinblick auf eingeschränkt verfügbare Proben wichtig. Gerade wenn bei Männern mit verminderter Spermienanzahl oder eingeschränkter Motilität die Befruchtung auf natürlichem Weg schwierig ist, ist es von besonderer Bedeutung jedes einzelne Spermium, welches motil ist, zu selektieren. Ein besonderer Aspekt hierbei ist die Beurteilung der Motilität von Patienten mit Kryptozoospermie oder Azoospermie, die sich einer TESE (Testikuläre Spermien Extraktion) oder anderen operativen Verfahren unterziehen. (Palomar Rios u. a. 2018)

Wenn man die Ergebnisse der verschiedenen Studien betrachtet, kommt man zu dem Schluss, dass der Vergleich von verschiedenen Samen-Parametern bei fertilen Männern oft nicht ausreicht, um diesen Mann als fertil oder infertil zu betrachten. Zudem sollte immer darauf hingewiesen werden, dass neben dieser Bestimmung der Samenparameter auch viele andere Eigenschaften wie z.B. Fähigkeit zur Erektion oder Ejakulation für die Fertilität ausschlaggebend sind.

In vielen weiteren Studien, bei denen mehrere Parameter untersucht wurden und zusätzlich die Funktion der testikulären Produktion und Reifung berücksichtigt wurde, konnten Zusammenhänge zwischen Fertilität und den erhobenen Parametern dieser Studien nachgewiesen werden (Guzick u. a. 2001). In einem Review wurde darauf hingewiesen, dass die Kombination aus verschiedenen Untersuchungsmethoden und die Evaluierung von verschiedenen Parametern des Ejakulats am sinnvollsten für die weitere Diagnostik und die Therapieempfehlung bei Infertilität bzw. der Empfehlung für ART (assisted reproductive technology) sind. (Barratt u. a. 2010) Hinzu kommt, dass auch empfohlen wird, die aktuellen Grenzwerte für die Bestimmung der Parameter herabzusetzen, da in einigen Studien fertile Männer als subfertil klassifiziert wurden, obwohl deren Frauen zum Zeitpunkt der Diagnostik schwanger wurden. Niedrigere Grenzwerte sollen demnach einen viel höheren positiven prädiktiven Wert und negativen prädiktiven Wert aufweisen. (van der Merwe u. a. 2005)

5.4. Einfluss des Kalziums auf die Motilität von Spermien (Calcium Imaging)

Schon vor 30 Jahren konnte bei humanen Spermien ein Ca^{2+} -Einstrom als Folge von Kontakt mit humanen folliculärem Fluid beobachtet werden (Thomas und Meizel 1988). Kalzium wird als unabdingbar in verschiedenen zellulären Prozessen angesehen und spielt eine wichtige Rolle als „Second Messenger“ (Darszon u. a. 2011) im Metabolismus von Spermatozoen.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Unsere Ergebnisse der Untersuchung des Calcium-Einstroms unter Einfluss von Glykolsäure auf die Spermatozoe ergaben sowohl in der Intensität als auch in der Anzahl gezählter Spermien mit Calcium-Einstrom keinen signifikanten Unterschied in der Aufnahme von Calcium. Obwohl unter Glykolsäure-Einfluss die Hyperaktivität der Spermien zugenommen hat und schon Suarez und Dai (1995) einen durch einen Ca^{2+} -Einstrom bedingte Steigerung der Beweglichkeit des Spermium-Flagellums beobachten konnten, wurde in unseren Experimenten kein erhöhter Calcium Einstrom festgestellt. Dies könnte daran liegen, dass andere Prozesse in der gesteigerten Vorwärts-Beweglichkeit von Bedeutung sind. Auch kann Calcium nicht nur extrazellulär durch Ca^{2+} -Kanäle (u.a. CatSper) in das Spermium gelangen (Darszon u. a. 2011). Es kann alternativ auch aus intrazellulären Calcium-Speichern mobilisiert werden (Kirichok u.a. 2006). Einer dieser Speicher ist im Mittelstück des Spermiums in der mitochondrialen Außenmembran, wo ein Cluster von Membran-Vesikeln (Franklin 1968) als wichtiger Ca^{2+} -Speicher für die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Konzentration im Spermium dient. Diese Konzentration wird strikt limitiert und von sehr vielen verschiedenen Zellmechanismen reguliert, die gut konserviert in ganz bestimmten Arealen des Spermiums zu finden sind (Darszon u. a. 2011). In einer aktuellen Studie zur Untersuchung der Korrelation von Asthenozoospermie und der CatSper-Expression wurde eine signifikant niedrigere CatSper-Expression in Zusammenhang mit Asthenozoospermie gefunden. Hier spielte auch die unterschiedliche lokale Expression eine Rolle, die bei Spermien von Asthenozoospermie-Patienten nicht nur auf den Hauptteil des Flagellums beschränkt war (Tamburrino u. a. 2015).

5.5. Mitochondriale Aktivität unter Glykolsäure-Einfluss

In unserem Experiment konnten wir zeigen, dass die Anzahl der Spermien mit aktivem Mitochondrium in Gegenwart von Glykolsäure nicht signifikant ansteigt oder abfällt. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Ergebnissen der Literatur, in der die mitochondriale Aktivität unter der Zugabe von Glucose untersucht wurde. Da in diesem Zusammenhang auch kein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom zu beobachten war, gingen wir auch davon aus, dass unter Glykolsäure auch ein Anstieg der mitochondrialen Aktivität ausbleibt. Da die Mitochondrien in Spermien eine große Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase und einen wichtigen intrazellulären Ca^{2+} -Speicher darstellen (Costello u. a. 2009) lag diese Vermutung nahe.

Mukai und Okuno (2004) fanden, dass unter Zugabe von Glucose zwar die Motilität von Mäuse-Spermien anstieg, jedoch keine Zunahme der mitochondrialen Aktivität zu messen war. In diesem Versuchsansatz wurde die mitochondriale Aktivität mit JC-1 evaluiert. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Glykolyse eine größere Rolle bei der Motilität der Spermien spielt, als die oxidative Phosphorylierung der mitochondrialen Atmungskette (du Plessis u. a. 2015). Auch andere Studien, welche das mitochondriale Membranpotenzial in

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Männern mit Asthenozoospermie evaluierten, kamen zu dem Schluss, dass in einigen Fällen die mitochondriale Funktion nicht eingeschränkt war. (Piasecka und Kawiak 2003) Auch in andere Studien wurde postuliert, dass in humanen Spermien die Rolle von Mitochondrien bei der Energieversorgung geringer ist als die der Glykolyse. Auch die Ergebnisse einer Studie von Williams und Ford (2001) zeigen, dass die Motilität und andere Funktionen von Spermien unter Ausschluss von OXPHOS Substraten (Substrate für die oxidative Phosphorylierung) nicht eingeschränkt war, während die Funktionen bei fehlenden Hexosen stark beeinträchtigt war.

In einem Review von Piomboni u. a. (2012) wurden mindestens drei verschiedene Shuttles (Moleküle, welche als Transporter und Austauscher für Stoffwechselprodukte dienen, z.B. Laktat/Pyruvat u.a.) herausgearbeitet mit der Fragestellung, wie die Mitochondrien im Sinne der Energieversorgung des Spermiums agieren. Zusätzlich wurden mögliche Erklärungsansätze beschrieben, wie humane Spermien ihre mitochondriale Funktion zur Energieversorgung nutzen, welche Transporter in der inneren mitochondrialen Membran tatsächlich genutzt werden und wie sich die Relevanz des mitochondrialen Einflusses abhängig vom metabolischen Status des Spermiums ändert.

5.6. CatSper-Immunhistochemie

In unserer CatSper1-Immunhistologischen Untersuchung für bovine (n=2) und humane (n=2) Spermien konnten wir folgende Beobachtungen beschreiben. Die Bande bei beiden humanen Proben zwischen 70 kDa und 100 kDa könnte der CatSper1-Untereinheit zugerechnet werden, da in den wesentlichen biotechnologischen Datenbanken das Protein CatSper1 mit 90.1 kDa angegeben wird (Ensembl, UniProt 2021). Die beiden Banden bei der Human 2 Probe könnten entweder auf Verunreinigungen oder andere CatSper-Untereinheiten bestehen. Die CatSper2-4 Untereinheiten werden mit einem Gewicht von 46.2 kDa bis 61.4 kDa beschrieben (Proteinatlas, UniProt 2021). Die etwas weniger starke Bande zwischen 30 kDa und 50 kDa könnte auch eine dieser Untereinheiten hindeuten. Besonders interessant ist, dass bei den bovinen Proben keine Bande von CatSper1 detektiert werden konnte. Stattdessen konnten wir Banden zwischen 5 und 15 kDa beobachten. Unsere Ergebnisse weichen diesbezüglich von der Literatur ab. Johnson u. a. (2017) fanden heraus, dass in bovinen Spermien zwei Exons translatiert werden, bei denen die Sequenz-Identität zu humanen Spermien CatSper1 bei 90 % und bei CatSper3 zu 72 % identisch war. Die Expression von CatSper1 in Bullen war laut Johnson u. a. (2017) bis zu 2 mal höher als CatSper3 oder CatSper4.

Dass die Sequenz der Gene von CatSper1 – 4 gut konserviert ist, zeigt auch eine Studie, in der nachgewiesen wurde, dass CatSper1 – 3 nur in Hodengewebe und CatSper4 in Hodengewebe und in geringen Mengen in Placenta und Lunge von Menschen und Mäusen

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

exprimiert wird. (Lobley u. a. 2003) Da CatSper1 und CatSper2 ausschließlich in Säugetier-Hoden nachgewiesen wurden, wird ihre Rolle als hochkonservierte spezialisierte Flagellen-Proteine als wichtig angesehen (X. Sun u. a. 2017) allerdings gibt es bis jetzt noch keine Studie die nahelegt, ob Untereinheiten wie CatSper β oder CatSper γ zu Infertilität bei Männern führen (Ren u. a. 2001) Auch andere Studien kamen zu dem Ergebnis, das alle vier funktionierenden Untereinheiten des CatSper-Kanals essentiell für die Befruchtung sind. Dies bezog sich nicht nur auf die Befruchtung, sondern auch auf die Motilität, die bei den Mäuse-Spermien in dieser Studie evaluiert wurde. (Qi u. a. 2007)

Interessant hierbei ist, dass mRNA Expression von CatSper1 in Hodengewebe gefunden wurde und von Kirichok u.a. (2006) in einer Population von subfertilen Männern untersucht und signifikant reduzierte Level von CatSper1 Expression bei Männern mit Asthenozoospermie gefunden wurden. Diese Beobachtung führte sogar dazu, dass die CatSper1-Expressionmuster als nicht-invasive Screening Methode genutzt werden sollte um unerkannte oder unerklärte männliche Infertilität zu diagnostizieren (Nikpoor u. a. 2004). Dies führte dazu, dass man unter anderem diese Expression nun dazu nutzen möchte, um Infertilität auch auf molekularem Level abzuklären. Diese sollen nun auch in die routinemäßige Untersuchung der Ejakulate in der Klinik Anwendung finden (Kliesch u.a. 2021).

5.7. Bindung verschiedener Zucker auf der Oberfläche von konservierten Spermien

5.7.1. Lokalisation und Charakterisierung

In unseren Versuchen konnten wir feststellen, dass FITC-markierte Zuckerreste wie Sialinsäure, Fucose und Galactose an die Oberfläche von Spermien binden. Diese Bindung beschränkte sich auf den akrosomalen Teil des Spermien-Kopfes. Die Auswahl dieser Zucker begründet sich auf verschiedene Literaturangaben, welche die folgenden Zuckerreste mit der Bildung eines Spermien-Speichers bei verschiedenen Spezies in Verbindung bringen. (Susan S. Suarez 2015) In vielen anderen Studien wurden die Zuckerreste auf der Plasmamembran von Spermien im Tiermodell untersucht und verglichen (Teclé und Gagneux 2015). Unseren Studien am nächsten kommt wohl eine Untersuchung der glykosylierten Proteine auf der Oberfläche von humanen Spermien. Sun u. a. (2016) untersuchten 60 verschiedene humane Lektine, um deren Bindung an humane Spermien nachzuweisen. Sie fanden, dass GlcNAc-T6, Galectin-1, -7, -8 und ERGIC-53 spezifisch an Spermien gebunden waren. Interessanterweise zeigten diese Versuche auch, dass die Bindung vor allem im Kopfteil, oder im mitochondrialen Stück des Spermiums stattfand. Ihre Zusammenfassung legt nahe, dass fünf positive Lektin-Gruppen und Lektin-ähnliche Proteine spezifisch für drei Typen von Glykanen sind. Diese sind Sialinsäure, Galactose und Mannose. (Sun u. a. 2016)

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Allgemein wird vermutet, dass neben löslichen und sekretierten Proteinen, die Lektine vor allem in der Gruppe der Membranproteine zu finden sind (Köttgen u.a. 2003). Es gibt vier verschiedene Typen von humanen Lektinen: C-Typ, P-Typ, S-Typ und I-Typ (Varki 2011). Die C-Typ Lektine brauchen Ca^{2+} -Ionen für die Bindung und erkennen verschiedene Zucker-Residuen. P-Typ Lektine erkennen Mannose-6-Phosphat Rezeptoren und S-Lektine Sialinsäure-Reste. Galectine werden einer Gruppe von Proteinen zugeordnet welche β -Galactose am Zuckerende erkennt.

In unseren Versuchen haben wir versucht, die verschiedenen Zuckerreste auf die Spermien zu geben, und durch Waschen eine mögliche feste Zuckerbindung an Lektine, welche auf der Plasmamembran der Spermien vermutet wird nachzuweisen. Die Glykan-Strukturen auf der Oberfläche von Spermien sind natürlicherweise als weitaus komplizierter zu betrachten als die Glykokalix anderer Spezies. Als endogene Proteine müssten Lektine eine hohe Spezifität und stärkere adhärente Kräfte aufweisen um mit anderen Molekülen eine Wechselwirkung einzugehen (Y. Sun u. a. 2016) Von Bedeutung sind auch Studien die belegen, dass die Kapazitation von humanen Spermien mit einer Reduktion von Sialinsäure-Glykokonjugaten auf deren Plasmamembran einhergeht (Focarelli u.a. 1990). Bis dato war völlig unbekannt, dass während der Kapazitation Zucker-Reste auf der Plasma-Membran verloren gehen. Auch dies könnte unter anderem ein Grund sein, warum viele der Spermien in unseren Experimenten keine Zuckerbindung zeigen, obwohl diese noch nicht die Kapazitation eingetreten waren. Es wurden auf der Oberfläche von Spermien auch zwei Sialidasen NEU1 und NEU3 entdeckt, welche eine Rolle in der Kapazitation spielen sollen. Zudem wurde in der gleichen Studie durch Antikörper-Markierung beobachtet, dass humane Spermien-Proben von infertilen Patienten entweder ein völliges Fehlen oder eine eingeschränkte Menge von NEU1 und NEU3 exprimierten (Ma u. a. 2012).

Der Rückgang von Sialinsäure auf der Oberfläche von Spermien wird auch als Hauptfaktor für Spermien-Reifung angesehen (Xin u. a. 2014). Wenn man einen weiteren Blick auf die Synthese, Zusammensetzung und Modifizierung der Spermien-Glykokalix wirft, kann man erkennen, dass auch innerhalb einer Population und sogar innerhalb einer Samenprobe eine große Heterogenität herrscht. Diese Unterschiede können durch post-meiotische, haploide Gen-Expression von Enzymen, welche in der Glykan-Synthese eine Rolle spielen bedingt sein. Außerdem können verschiedene Modifikationen beim epididymalen Transit oder die Variabilität in der Zusammensetzung von Glykokonjugaten durch verschiedene akzessorische Drüsen gegeben sein. All diese Faktoren könnten auch darauf hinweisen, dass die Glykane auf der Oberfläche von Spermien ihre Qualität in Hinblick auf die Befruchtung widerspiegeln. (Teclé und Gagneux 2015)

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

5.7.2. Bedeutung der Bindung für die Bildung eines Spermienreservoirs und Einschränkungen der Zucker-Bindung bei eingeschränkter Fertilität

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass zwar eine Bindung von verschiedenen Zuckerresten an die Plasmamembran von humanen Spermien möglich ist, jedoch konnten wir keinen Zusammenhang zwischen reduzierter Bindung und möglicher eingeschränkter Beweglichkeit oder Anzahl an Spermien im Ejakulat herstellen. Unseren Ergebnissen zufolge konnte sogar eine signifikante Zunahme von Spermien mit gebundener Sialinsäure, Mannose und Fucose bei Asthenozoospermie und von gebundener Mannose bei Oligozoospermie beobachtet werden. Bis dato konnten nur wenige Studien einen Zusammenhang zwischen der eingeschränkten Fertilität und den verschiedenen Lektinen und deren Zuckerbindung herstellen. Zucker und Zuckerresiduen wurden in nur wenigen Studien untersucht.

In einer Studie wurden Lektine untersucht, welche Reaktionen im Seminalplasma auslösten. Hier wurde beobachtet, dass MAA (Mannose-bindendes Lektin) und SNA (Sialinsäure-bindendes Lektin) höhere Reaktivität im Seminalplasma von Leukozyten-haltigen Sperma als in der Vergleichsgruppe. (Kratz u. a. 2015) Sialinsäure-Reste an sich wurden allerdings nicht im Oviduct nachgewiesen (Gheri u. a. 2007) was den Schluss nahelegt, dass die Sialinsäure-Reste auf der Plasmamembran der Spermien begrenzt vorkommen. Einige andere Studien lassen den Einfluss von Sialinsäure-Resten im Oviduct auf den Erhalt der Vitalität von Säugetier-Spermien und die Fähigkeit zur Kapazitation vermuten (Gheri u. a. 2007; Apichela u. a. 2010) Diese Beobachtungen stützen unsere These, dass Sialinsäure-Reste sowohl im Epithel des Ovidukts (eigene Beobachtungen) als auch auf der Spermienplasmamembran zu finden sind (Teclé und Gagneux 2015).

Die Bindung von Spermatozoen an den weiblichen Eileiter und eine Formation eines menschlichen Spermien-Reservoirs wurde bisher sowohl aus ethischen wie auch aus technisch schwer umsetzbaren Gründen wenig untersucht. Es wurde diskutiert, ob diese Interaktion durch Zell-Adhäsionsmoleküle zustande kommt, welche sowohl auf der Oberfläche des Eileiter-Epithels als auch auf der Spermienplasmamembran sind (Suarez 2008). In anderen Spezies vermitteln Kohlenhydrate spezies-spezifische Bindung zur Formation eines Spermienreservoirs. (Apichela u. a. 2010; S. S. Suarez u. a. 1998) So konnte in Hamstern beobachtet werden, dass Sialinsäure-Reste für die Interaktion zwischen Spermium und dem Epithel des Eileiters essential war (DeMott u.a. 1995) Auch in anderen Säugetieren wird die Bindung von Spermien über spezies-spezifische Kohlenhydratreste vermittelt. Diese (Fucose) können unter anderem an den Zilien des bovinen Eileiters lokalisiert sein (Lefebvre u.a. 1997). Im humanen Ovidukt können verschiedene Typen von Sialo-Derivaten sowohl auf der

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Oberfläche von sekretorischen, wie auch auf Zilien-tragenden Zellen beobachtet werden, hier mit den Lektinen MAA und SNA markiert (Gheri u. a. 2007). Diese Beobachtung führte uns zu der Annahme, dass Sialinsäure-Reste demnach auch auf der Plasmamembran von humanen Spermien zu finden sein könnten. Die genannten Zucker-Residuen weisen eine negative Ladung auf und es wird demnach vermutet, dass Spermatozoen an die epithelialen Zellen aufgrund der zusätzlichen Bindung von Ca^{2+} -Ionen binden könnten (Gabrielli u. a. 2004; Leese u. a. 2001). Die Bedeutung von Sialinsäure-Resten bei der Kapazitation fanden schon Ma u. a. (2012). In diesem Versuch wurde gezeigt, dass Mäuse-Spermien Neu5Ac und Neu5Gc und humane Spermien Neu5Ac Zucker-Residuen bei der Kapazitation verlieren und diese dann im Plasma nachgewiesen wurden. Obwohl (Gheri u. a.(2007) den Nutzen von Sialoglycoproteinen aufgrund der geringen Größe anzweifeln, kann bis dato nicht ausgeschlossen werden, dass Sialinsäure-Derivate zusätzlich für die Interaktion von Spermium und Eileiter von Bedeutung sind. In weiteren Studien wurde festgestellt, dass der Kontakt von humanen Spermien an das Epithelium des Eileiters wichtig ist für eine erfolgreiche Kapazitation (Kervancioglu u.a. 1994; Murray und Smith 1997).

Auch in früheren Studien konnten wir Sialinsäure-bindende Motive auf der Plasmamembran nachweisen. Damals konnten wir den fluoreszenz-gestützten Nachweis von bindenden Motiven für Sialinsäure-Derivate auf nur in der Kopfregion von einzelnen Spermatozoen nachweisen. Auch in diesen Versuchen konnten die Bindungen der Zucker-Motive von Sialinsäure, Mannose und Fucose in der Kopf-Region beobachtet werden. Diese Ergebnisse decken sich auch mit Ergebnissen von Studien mit Ratten-Spermien (Cortés u. a. 2004) und Hamster-Spermien (DeMott u.a. 1995) wo Sialinsäure-Reste als wichtiger Ko-Spieler in der Spermien-Oviduct-Interaktion angesehen wurden.

Wie wichtig die Adhäsion für Spermien an eine Oberfläche ist und welche Auswirkung sie auf deren Motilität hat, konnte in anderen Studien gezeigt werden. Mäuse-Spermien, welche im Epithel des Eileiters gebunden waren, zeigten zur Zeit der Ovulation eine Loslösung und eine Kontaktherstellung im Wechsel, bevor sie den Ort der Spermien-Reservoirs endgültig verließen (Chang und Suarez 2012). In einem anderen Experiment konnten (Denissenko u. a. 2012) die Wichtigkeit von Oberflächen-Bindung anhand von Bewegungsmustern belegen. In diesem Versuchsaufbau wurde eine Oberfläche aus Polymethylsiloxane (PDMS) in mikroskopisch kleinen Kanälen. Als Ergebnis konnte beschrieben werden, dass Spermien sich nur entlang der Wände bewegten. Spermien ohne Oberflächenkontakt bewegten sich in konzentrischen Kreisen ohne Richtung. Diese Mikroarchitektur legt nahe, dass die Architektur der uterotubalen Region auch essentiell dazu dient, dass Spermien in einer gezielte Richtung entlang des Eileiters zur Oozyte schwimmen können (Suarez 2016).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

5.8. Ausblick

Unsere Ergebnisse mit dem Einsatz von Glykolsäure zeigen, dass in der Behandlung von Asthenozoospermie und auch in der Zucht von Nutztieren die Besserung der Motilität von Spermien mit verschiedenen Agenzien möglich wäre. Hierzu sind sicherlich weitere Forschungen nötig, um Langzeitwirkung und tatsächliche Erfolge in der Reproduktion absehen zu können.

Die vielfältigen Methoden, welche in der andrologischen Diagnostik zur Abklärung der Fertilität genutzt werden, haben sich in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt. Vor allem die Evaluierung der Samenparameter sollte aber vor dem Hintergrund zahlreicher Studien, welche keinen Zusammenhang von einzelnen Parametern wie Morphologie oder Motilität und Fertilität beobachten konnten, nochmals in Frage gestellt werden. Zudem hängt die Qualität eines SpermioGRAMMS auch stark von der jeweiligen Tages- und Lebenssituation des Mannes ab. Vor dem Hintergrund einer beträchtlichen Menge von neuen molekularen Markern und dem immer besser werdenden Verständnis molekularer Zusammenhänge auf zellulärer Ebene sollten in der andrologischen Diagnostik vermehrt Gendiagnostik und/oder molekulare Diagnostik des Ejakulats eingeführt werden, um so die Rate der idiopathischen Infertilität von Männern möglicherweise zu reduzieren und detailliertere Erkenntnisse bzgl. der Ursache zu bekommen. Zusätzliche könnten so neue, innovative Therapieansätze in der Zukunft entwickelt werden.

6. Zusammenfassung

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die Vorwärtsbeweglichkeit von Spermien sowohl in humanen als auch in weiteren Spezies eine große Rolle einnimmt.

Zudem wurde nachgewiesen, dass der Einfluss von Glykolsäure auf die Motilität von humanen und bovinen Spermien einen stark positiven Effekt hat. Dies gilt vor allem für frische humane Ejakulate als auch für kryokonservierte bovine Ejakulate. Vor allem zum Zeitpunkt direkt nach Zugabe und nach 30 min. konnten wir durch unsere Versuche eine signifikante Verbesserung der Vorwärtsprogression der Spermien beobachten.

Zur Klärung der Frage nach dem Aufnahmemechanismus von Glykolsäure in das Spermium postulieren wir, dass der Calcium-Kanal CatSper1 nicht zur Aufnahme von Glykolsäure führt. Der CatSper1-Kanal Blocker NNC 55-0396 führt zu einer signifikant niedrigeren Motilität von humanen und bovinen Spermien, jedoch kann dieser Effekt mit Glykolsäure kompensiert werden. Dies bedeutet, dass Glykolsäure mit großer Wahrscheinlichkeit nicht über den Kalzium-Kanal CatSper1 in das Spermium aufgenommen wird. Zudem kann kein signifikant höherer Ca^{2+} -Einstrom unter Einfluss von Glykolsäure in die Spermien (human) beobachtet werden. Weiter zeigt die Immunhistochemie verschiedene Expressionsmuster von CatSper1 in humanen und bovinen Protein-Extrakten aus Spermien. Diese Experimente führen uns zu der Erkenntnis, dass die Aktivierung der Motilität über einen anderen Mechanismus stattfinden muss.

Die mitochondriale Aktivität unter dem Einfluss von Glykolsäure bleibt konstant und so kann man resümieren, dass eine gesteigerte Motilität nicht zwingend mit einer Aktivierung oder der Rekrutierung der mitochondrialen Atmungskette in Verbindung steht.

In den Versuchen mit den verschiedenen Zuckern im Puffer-Medium der Spermien, kann beobachtet werden, dass die Zugabe von Glucose nahezu den gleichen Effekt auf die Motilität von Spermien aufweist wie die Zugabe von Glykolsäure. Auch Fucose steigerte die Motilität, allerdings weniger effektiv als die beiden anderen Agenzien. Diese Beobachtung lässt die Annahme zu, dass Glykolsäure über Hexose-transportierende Mechanismen in das Spermium aufgenommen wird.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auf der Oberfläche der Spermienplasmamembran verschiedene Zucker gebunden werden (Glucose, Mannose und Fucose). Diese Bindung wird quantifiziert und ein signifikant höherer Anteil an Spermien mit gebundenem Zucker bei Oligozoospermie- und Asthenozoospermie-Ejakulaten gefunden. Dies könnte entweder mit einer vorbestehenden Schädigung der Spermien in Verbindung stehen oder andere Gründe haben. Beim Vergleich von Ejakulaten von Männern mit

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

unerfülltem Kinderwunsch und Ejakulaten von Vätern konnte bei den Probanden mit Kinderwunsch eine signifikant niedrigere Anzahl von Spermien mit gebundenem Zucker nachgewiesen werden (Sialinsäure-Reste und Mannose). Dies führt uns zu der Annahme, dass FITC-markierte Zucker eventuell zum Nachweis einer Fertilität genutzt werden könnten, bei fehlender Relevanz von herkömmlichen andrologischen Markern. Dies zeigt auch die letzte Auswertung der Korrelation von Spermatogramm-Parametern mit der Korrelation von Kinderwunsch und nachweislich gezeugten Kindern.

Diese Arbeit untersucht molekulare Mechanismen der Vorwärts-Progression von Spermien unter dem Einfluss verschiedener Agenzien und evaluiert somit eine Substanz, die z.B. im Rahmen einer künstlichen Befruchtung (etwa einer ICSI- oder IVF-Behandlung) bei Paaren mit Asthenozoospermie infrage kommen könnte. Diese Arbeit soll weiter darauf hinweisen, dass das Verständnis um die Wichtigkeit molekularer Marker in der Abklärung der männlichen Fertilität verbessert werden muss. Dies könnte die Diagnose einer idiopathischen Infertilität reduzieren und eventuell innovative Therapieansätze ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- Abou-haila, Aïda, und Daulat R. P. Tulsiani. 2009. „Signal Transduction Pathways That Regulate Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction“. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 485 (1): 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.02.003>.
- Angulo, C., M. C. Rauch, A. Droppelmann, A. M. Reyes, J. C. Slebe, F. Delgado-López, V. H. Guaiquil, J. C. Vera, und I. I. Concha. 1998. „Hexose Transporter Expression and Function in Mammalian Spermatozoa: Cellular Localization and Transport of Hexoses and Vitamin C“. *Journal of Cellular Biochemistry* 71 (2): 189–203.
- Ankel-Simons, F., und J. M. Cummins. 1996. „Misconceptions about Mitochondria and Mammalian Fertilization: Implications for Theories on Human Evolution“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24): 13859–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13859>.
- Apichela, Silvana A., Jorge N. Valz-Gianinet, Stefanie Schuster, María A. Jiménez-Díaz, Eugenia M. Roldán-Olarte, und Dora C. Miceli. 2010. „Lectin Binding Patterns and Carbohydrate Mediation of Sperm Binding to Llama Oviductal Cells in Vitro“. *Animal Reproduction Science* 118 (2–4): 344–53. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.07.008>.
- Barkalina, Natalia, Celine Jones, Junaid Kashir, Siobhan Coote, Xinyue Huang, Rachel Morrison, Helen Townley, und Kevin Coward. 2014. „Effects of Mesoporous Silica Nanoparticles upon the Function of Mammalian Sperm in Vitro“. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 10 (4): 859–70. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.10.011>.
- Barratt, Christopher L. R., R. John Aitken, Lars Björndahl, Douglas T. Carrell, Peter de Boer, Ulrik Kvist, Sheena E. M. Lewis, u. a. 2010. „Sperm DNA: Organization, Protection and Vulnerability: From Basic Science to Clinical Applications—a Position Report“. *Human Reproduction (Oxford, England)* 25 (4): 824–38. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep465>.
- Brandes, M., C. J. C. M. Hamilton, J. O. M. van der Steen, J. P. de Bruin, R. S. G. M. Bots, W. L. D. M. Nelen, und J. a. M. Kremer. 2011. „Severity of Oligo-Asteno-Teratozoospermia No Longer Determines Overall Success Rate in Male Subfertility“. *International Journal of Andrology* 34 (6 Pt 1): 614–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01128.x>.
- Bucci, Diego, Juan Enrique Rodriguez-Gil, Claudia Vallorani, Marcella Spinaci, Giovanna Galeati, und Carlo Tamanini. 2011. „GLUTs and Mammalian Sperm Metabolism“. *Journal of Andrology* 32 (4): 348–55. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.011197>.
- Bussalleu, Eva, Elisabet Pinart, Marc Yeste, Mailo Briz, Silvia Sancho, Nuria Garcia-Gil, Elena Badia, u. a. 2005. „Development of a Protocol for Multiple Staining with Fluorochromes to Assess the Functional Status of Boar Spermatozoa“. *Microscopy Research and Technique* 68 (5): 277–83. <https://doi.org/10.1002/jemt.20246>.
- Chang, Haixin, und Susan S. Suarez. 2012. „Unexpected Flagellar Movement Patterns and

- Epithelial Binding Behavior of Mouse Sperm in the Oviduct". *Biology of Reproduction* 86 (5): 140, 1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096578>.
- Chaouat, Gérard. 2013. „Inflammation, NK Cells and Implantation: Friend and Foe (the Good, the Bad and the Ugly?): Replacing Placental Viviparity in an Evolutionary Perspective“. *Journal of Reproductive Immunology* 97 (1): 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.009>.
- Cooper, Trevor G., Elizabeth Noonan, Sigrid von Eckardstein, Jacques Auger, H. W. Gordon Baker, Hermann M. Behre, Trine B. Haugen, u. a. 2010. „World Health Organization Reference Values for Human Semen Characteristics“. *Human Reproduction Update* 16 (3): 231–45. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>.
- Cortés, Paula P., Pedro A. Orihuela, Lidia M. Zúñiga, Luis A. Velásquez, und Horacio B. Croxatto. 2004. „Sperm Binding to Oviductal Epithelial Cells in the Rat: Role of Sialic Acid Residues on the Epithelial Surface and Sialic Acid-Binding Sites on the Sperm Surface“. *Biology of Reproduction* 71 (4): 1262–69. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.027474>.
- Costello, Sarah, Francesco Michelangeli, Katherine Nash, Linda Lefievre, Jennifer Morris, Gisela Machado-Oliveira, Christopher Barratt, Jackson Kirkman-Brown, und Stephen Publicover. 2009. „Ca²⁺-Stores in Sperm: Their Identities and Functions“. *Reproduction (Cambridge, England)* 138 (3): 425–37. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0134>.
- Darszon, Alberto, Takuya Nishigaki, Carmen Beltran, und Claudia L. Treviño. 2011. „Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa“. *Physiological Reviews* 91 (4): 1305–55. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2010>.
- DeMott, R. P., R. Lefebvre, und S. S. Suarez. 1995. „Carbohydrates Mediate the Adherence of Hamster Sperm to Oviductal Epithelium“. *Biology of Reproduction* 52 (6): 1395–1403.
- Deng, Zibing, Fei Chen, Meixia Zhang, Lan Lan, Zhijiao Qiao, Yan Cui, Jinghuan An, u. a. 2016. „Association between Air Pollution and Sperm Quality: A Systematic Review and Meta-Analysis“. *Environmental Pollution* 208 (Januar): 663–69. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.044>.
- Denissenko, Petr, Vasily Kantsler, David J. Smith, und Jackson Kirkman-Brown. 2012. „Human Spermatozoa Migration in Microchannels Reveals Boundary-Following Navigation“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (21): 8007–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202934109>.
- Dorval, Véronique, Maurice Dufour, und Pierre Leclerc. 2002. „Regulation of the Phosphotyrosine Content of Human Sperm Proteins by Intracellular Ca²⁺: Role of Ca²⁺-Adenosine Triphosphatases“. *Biology of Reproduction* 67 (5): 1538–45. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004127>.
- Duncan, Mark W., und Heather S. Thompson. 2007. „Proteomics of Semen and Its Constituents“. *Proteomics. Clinical Applications* 1 (8): 861–75. <https://doi.org/10.1002/prca.200700228>.
- Eddy, Edward M., Kiyotaka Toshimori, und Deborah A. O'Brien. 2003. „Fibrous Sheath of Mammalian Spermatozoa“. *Microscopy Research and Technique* 61 (1): 103–15.

<https://doi.org/10.1002/jemt.10320>.

Ellington, J. E., G. G. Igotz, D. D. Varner, R. S. Marcucio, P. Mathison, and B. A. Ball. 1993. „In Vitro Interaction between Oviduct Epithelial and Equine Sperm“. *Archives of Andrology* 31 (2): 79–86.

Espino, Javier, Matías Mediero, Graciela M Lozano, Ignacio Bejarano, Águeda Ortiz, Juan F García, José A Pariente, and Ana B Rodríguez. 2009. „Reduced levels of intracellular calcium releasing in spermatozoa from asthenozoospermic patients“. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 7 (Februar): 11. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-11>.

Esteves, S. C., R. K. Sharma, A. J. Thomas, and A. Agarwal. 2000. „Improvement in Motion Characteristics and Acrosome Status in Cryopreserved Human Spermatozoa by Swim-up Processing before Freezing“. *Human Reproduction (Oxford, England)* 15 (10): 2173–79. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.10.2173>.

Fang, Q., J. Wang, Y. Y. Hao, H. Li, J. X. Hu, G. S. Yang, and J. H. Hu. 2017. „Effects of Iodine Methionine on Boar Sperm Quality during Liquid Storage at 17°C“. *Reproduction in Domestic Animals* 52 (6): 1061–66. <https://doi.org/10.1111/rda.13024>.

Ferramosca, Alessandra, Sara Pinto Provenzano, Lamberto Coppola, and Vincenzo Zara. 2012. „Mitochondrial Respiratory Efficiency Is Positively Correlated with Human Sperm Motility“. *Urology* 79 (4): 809–14. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.12.042>.

Feugang, Jean M. 2017. „Novel Agents for Sperm Purification, Sorting, and Imaging“. *Molecular Reproduction and Development* 84 (9): 832–41. <https://doi.org/10.1002/mrd.22831>.

Focarelli, Riccardo, Floriana Rosati, and Benedetto Terrana. 1990. „Sialylglycoconjugates Release During In Vitro Capacitation of Human Spermatozoa“. *Journal of Andrology* 11 (2): 97–104. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01587.x>.

Ford, W. C., and A. Harrison. 1981. „The Role of Oxidative Phosphorylation in the Generation of ATP in Human Spermatozoa“. *Journal of Reproduction and Fertility* 63 (1): 271–78. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0630271>.

Franklin, L. E. 1968. „Formation of the Redundant Nuclear Envelope in Monkey Spermatids“. *The Anatomical Record* 161 (2): 149–61. <https://doi.org/10.1002/ar.1091610202>.

Freitas, Maria João, Srinivasan Vijayaraghavan, and Margarida Fardilha. 2017. „Signaling Mechanisms in Mammalian Sperm Motility“. *Biology of Reproduction* 96 (1): 2–12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144337>.

Gabrielli, M. G., A. M. Bondi, G. Materazzi, and G. Menghi. 2004. „Differential Location and Structural Specificities of Sialic Acid-Beta-D-Gal Sequences Belonging to Sialoderivatives of Rabbit Oviduct under Hormonal Treatment“. *Histology and Histopathology* 19 (4): 1175–86.

Gao, D. Y., J. Liu, C. Liu, L. E. McGann, P. F. Watson, F. W. Kleinhans, P. Mazur, E. S. Critser, and J. K. Critser. 1995. „Prevention of Osmotic Injury to Human Spermatozoa during Addition and Removal of Glycerol“. *Human Reproduction (Oxford, England)* 10 (5): 1109–22. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103>.

- Gheri, Gherardo, Ivo Noci, Chiara F. Gheri, Debora Vichi, Giorgia D. Zappoli Thyron, Mirca Marini, Anna M. Buccoliero, und Eleonora Sgambati. 2007. „The Sialoglycoconjugates in the Oviducts of Fertile and Postmenopausal Women“. *Maturitas* 58 (3): 269–84. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2007.08.015>.
- Gollenberg, Audra L., Fan Liu, Charlene Brazil, Erma Z. Drobnis, David Guzick, James W. Overstreet, James B. Redmon, Amy Sparks, Christina Wang, und Shanna H. Swan. 2010. „Semen Quality in Fertile Men in Relation to Psychosocial Stress“. *Fertility and Sterility* 93 (4): 1104–11. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.018>.
- Green, C. E., J. Bredl, W. V. Holt, P. F. Watson, und A. Fazeli. 2001. „Carbohydrate Mediation of Boar Sperm Binding to Oviductal Epithelial Cells in Vitro“. *Reproduction (Cambridge, England)* 122 (2): 305–15.
- Grötter, Laura Guadalupe, Luciano Cattaneo, Patricia Estela Marini, Michael E. Kjelland, und Luis B. Ferré. 2019. „Recent Advances in Bovine Sperm Cryopreservation Techniques with a Focus on Sperm Post-Thaw Quality Optimization“. *Reproduction in Domestic Animals* 54 (4): 655–65. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>.
- Guzick, D. S., J. W. Overstreet, P. Factor-Litvak, C. K. Brazil, S. T. Nakajima, C. Coutifaris, S. A. Carson, u. a. 2001. „Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men“. *The New England Journal of Medicine* 345 (19): 1388–93. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa003005>.
- Hamilton, J. A. M., M. Cissen, M. Brandes, J. M. J. Smeenk, J. P. de Bruin, J. A. M. Kremer, W. L. D. M. Nelen, und C. J. C. M. Hamilton. 2015. „Total Motile Sperm Count: A Better Indicator for the Severity of Male Factor Infertility than the WHO Sperm Classification System“. *Human Reproduction* 30 (5): 1110–21. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev058>.
- Hammadeh, M. E., A. S. Askari, T. Georg, P. Rosenbaum, und W. Schmidt. 1999. „Effect of Freeze-Thawing Procedure on Chromatin Stability, Morphological Alteration and Membrane Integrity of Human Spermatozoa in Fertile and Subfertile Men“. *International Journal of Andrology* 22 (3): 155–62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1999.00162.x>.
- Harlev, Avi, Ashok Agarwal, Sezgin Ozgur Gunes, Amit Shetty, und Stefan Simon du Plessis. 2015. „Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review“. *The World Journal of Men's Health* 33 (3): 143–60. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2015.33.3.143>.
- Harper, M. J. 1973. „Relationship between Sperm Transport and Penetration of Eggs in the Rabbit Oviduct“. *Biology of Reproduction* 8 (4): 441–50.
- Ho, Han-Chen, Katherine A. Granish, und Susan S. Suarez. 2002. „Hyperactivated Motility of Bull Sperm Is Triggered at the Axoneme by Ca²⁺ and Not CAMP“. *Developmental Biology* 250 (1): 208–17. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0797>.
- Holt, W. V. 2000. „Basic Aspects of Frozen Storage of Semen“. *Animal Reproduction Science* 62 (1–3): 3–22. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00152-4).
- Horst, Gerhard van der, und Liana Maree. 2014. „Sperm Form and Function in the Absence of Sperm Competition“. *Molecular Reproduction and Development* 81 (3): 204–16.

<https://doi.org/10.1002/mrd.22277>.

Hotaling, James M., Darshan P. Patel, Christopher Vendryes, Natalya A. Lopushnyan, Angela P. Presson, Chong Zhang, Charles H. Muller, und Thomas J. Walsh. 2016. „Predictors of Sperm Recovery after Cryopreservation in Testicular Cancer“. *Asian Journal of Andrology* 18 (1): 35–38. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.155535>.

Hunter, R. H. 1981. „Sperm Transport and Reservoirs in the Pig Oviduct in Relation to the Time of Ovulation“. *Journal of Reproduction and Fertility* 63 (1): 109–17.

Ignatz, George G., Margaret Y. Cho, und Susan S. Suarez. 2007. „Annexins Are Candidate Oviductal Receptors for Bovine Sperm Surface Proteins and Thus May Serve to Hold Bovine Sperm in the Oviductal Reservoir“. *Biology of Reproduction* 77 (6): 906–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062505>.

Jang, Tae Hoon, Sung Choel Park, Ji Hyun Yang, Jung Yoon Kim, Jae Hong Seok, Ui Seo Park, Chang Won Choi, Sung Ryul Lee, und Jin Han. 2017. „Cryopreservation and Its Clinical Applications“. *Integrative Medicine Research* 6 (1): 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>.

Johnson, Gillian P., Anne-Marie English, Sinead Cronin, David A. Hoey, Kieran G. Meade, und Sean Fair. 2017. „Genomic Identification, Expression Profiling, and Functional Characterization of CatSper Channels in the Bovine†“. *Biology of Reproduction* 97 (2): 302–12. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0x082>.

Kervancioglu, M. E., O. Djahanbakhch, und R. J. Aitken. 1994. „Epithelial Cell Coculture and the Induction of Sperm Capacitation“. *Fertility and Sterility* 61 (6): 1103–8.

Kliesch Sabine „Praktisches Spermogramm‘ – Ejakulatdiagnostik gemäß WHO“. o. J. springermedizin.de. Zugegriffen 10. November 2021.

Kim, S. J., und Y. H. Won. 1998. „The Effect of Glycolic Acid on Cultured Human Skin Fibroblasts: Cell Proliferative Effect and Increased Collagen Synthesis“. *The Journal of Dermatology* 25 (2): 85–89.

Kirichok, Yuriy, Betsy Navarro, und David E. Clapham. 2006. „Whole-Cell Patch-Clamp Measurements of Spermatozoa Reveal an Alkaline-Activated Ca²⁺ Channel“. *Nature* 439 (7077): 737–40. <https://doi.org/10.1038/nature04417>.

Kölle, S. 2015. „Transport, Distribution and Elimination of Mammalian Sperm Following Natural Mating and Insemination“. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 50 Suppl 3 (September): 2–6. <https://doi.org/10.1111/rda.12576>.

Kölle, S., S. Reese, und W. Kummer. 2010. „New Aspects of Gamete Transport, Fertilization, and Embryonic Development in the Oviduct Gained by Means of Live Cell Imaging“. *Theriogenology* 73 (6): 786–95. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.002>.

Kölle, Sabine, Sabine Dubielzig, Sven Reese, Axel Wehrend, Peter König, und Wolfgang Kummer. 2009. „Ciliary Transport, Gamete Interaction, and Effects of the Early Embryo in the Oviduct: Ex Vivo Analyses Using a New Digital Videomicroscopic System in the Cow“. *Biology of Reproduction* 81 (2): 267–74. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073874>.

- Köttgen, Eckart, Werner Reutter, und Rudolf Tauber. 2003. „[Human lectins and their correspondent glycans in cell biology and clinical medicine]“. *Medizinische Klinik (Munich, Germany: 1983)* 98 (12): 717–38. <https://doi.org/10.1007/s00063-003-1318-1>.
- Kratz, Ewa M., Anna Kałuża, Mariusz Zimmer, und Mirosława Ferens-Sieczkowska. 2015. „The Analysis of Sialylation, N-Glycan Branching, and Expression of O-Glycans in Seminal Plasma of Infertile Men“. *Disease Markers* 2015: 941871. <https://doi.org/10.1155/2015/941871>.
- La Vignera, Sandro, Rosita Condorelli, Enzo Vicari, Rosario D'Agata, und Aldo E. Calogero. 2012. „Diabetes Mellitus and Sperm Parameters“. *Journal of Andrology* 33 (2): 145–53. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013193>.
- Lapointe, S., R. Sullivan, und M. A. Sirard. 1998. „Binding of a Bovine Oviductal Fluid Catalase to Mammalian Spermatozoa“. *Biology of Reproduction* 58 (3): 747–53.
- Leese, H. J., J. I. Tay, J. Reischl, und S. J. Downing. 2001. „Formation of Fallopian Tubal Fluid: Role of a Neglected Epithelium“. *Reproduction (Cambridge, England)* 121 (3): 339–46.
- Lefebvre, R., P. J. Chenoweth, M. Drost, C. T. LeClear, M. MacCubbin, J. T. Dutton, und S. S. Suarez. 1995. „Characterization of the Oviductal Sperm Reservoir in Cattle“. *Biology of Reproduction* 53 (5): 1066–74.
- Lefebvre, R., M. C. Lo, und S. S. Suarez. 1997. „Bovine Sperm Binding to Oviductal Epithelium Involves Fucose Recognition“. *Biology of Reproduction* 56 (5): 1198–1204.
- Lehtihet, M., und B. Hylander. 2015. „Semen Quality in Men with Chronic Kidney Disease and Its Correlation with Chronic Kidney Disease Stages“. *Andrologia* 47 (10): 1103–8. <https://doi.org/10.1111/and.12388>.
- Lishko, Polina V., Inna L. Botchkina, und Yuriy Kirichok. 2011. „Progesterone Activates the Principal Ca²⁺ Channel of Human Sperm“. *Nature* 471 (7338): 387–91. <https://doi.org/10.1038/nature09767>.
- Lishko, Polina V., Yuriy Kirichok, Dejian Ren, Betsy Navarro, Jean-Ju Chung, und David E. Clapham. 2012. „The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels“. *Annual Review of Physiology* 74: 453–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153258>.
- Lobley, Anna, Valerie Pierron, Lindsey Reynolds, Liz Allen, und David Michalovich. 2003. „Identification of Human and Mouse CatSper3 and CatSper4 Genes: Characterisation of a Common Interaction Domain and Evidence for Expression in Testis“. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 1 (August): 53. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-53>.
- Ma, Fang, Diana Wu, Liwen Deng, Patrick Secrest, June Zhao, Nissi Varki, Steven Lindheim, und Pascal Gagneux. 2012. „Sialidases on Mammalian Sperm Mediate Deciduous Sialylation during Capacitation“. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (45): 38073–79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380584>.
- MacDonald, A.A., G.P. Herbison, M. Showell, und C.M. Farquhar. 2010. „The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis“. *Human Reproduction Update* 16 (3): 293–311. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp047>.

- Manders, Marlies, Luke McLindon, Brittany Schulze, Michael M. Beckmann, Jan AM Kremer, und Cindy Farquhar. 2015. „Timed Intercourse for Couples Trying to Conceive“. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Nr. 3. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011345.pub2>.
- Marin, Silvia, Kelly Chiang, Sara Bassilian, Wai-Nang Paul Lee, Laszlo G. Boros, Josep Maria Fernández-Novell, Josep Joan Centelles, Antonio Medrano, Joan Enric Rodríguez-Gil, und Marta Cascante. 2003. „Metabolic Strategy of Boar Spermatozoa Revealed by a Metabolomic Characterization“. *FEBS Letters* 554 (3): 342–46. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01185-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01185-2).
- Medintz, Igor L., H. Tetsuo Uyeda, Ellen R. Goldman, und Hedi Mattoussi. 2005. „Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing“. *Nature Materials* 4 (6): 435–46. <https://doi.org/10.1038/nmat1390>.
- Merwe, F.H. van der, T.F. Kruger, S.C. Oehninger, und C.J. Lombard. 2005. „The Use of Semen Parameters to Identify the Subfertile Male in the General Population“. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 59 (2): 86–91. <https://doi.org/10.1159/000082368>.
- Mortimer, David. 2018. „The Functional Anatomy of the Human Spermatozoon: Relating Ultrastructure and Function“. *Molecular Human Reproduction* 24 (12): 567–92. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay040>.
- Mukai, Chinatsu, und Makoto Okuno. 2004. „Glycolysis Plays a Major Role for Adenosine Triphosphate Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement“. *Biology of Reproduction* 71 (2): 540–47. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026054>.
- Murray, S. C., und T. T. Smith. 1997. „Sperm Interaction with Fallopian Tube Apical Membrane Enhances Sperm Motility and Delays Capacitation“. *Fertility and Sterility* 68 (2): 351–57.
- Muthusami, K. R., und P. Chinnaswamy. 2005. „Effect of Chronic Alcoholism on Male Fertility Hormones and Semen Quality“. *Fertility and Sterility* 84 (4): 919–24. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.04.025>.
- Nijs, Martine, und Willem Ombelet. 2000. „Intracytoplasmic Sperm Injection in Assisted Reproductive Technology: An Evaluation“. *Human Fertility (Cambridge, England)* 3 (3): 221–25. <https://doi.org/10.1080/1464727002000199021>.
- Nijs, Martine, und Willem Ombelet. 2001. „Cryopreservation of Human Sperm“. *Human Fertility* 4 (3): 158–63. <https://doi.org/10.1080/1464727012000199232>.
- Nikpoor, Parvaneh, S. Javad Mowla, Mansoureh Movahedin, S. Amir-Mohsen Ziaee, und Taki Tiraihi. 2004. „CatSper Gene Expression in Postnatal Development of Mouse Testis and in Subfertile Men with Deficient Sperm Motility“. *Human Reproduction (Oxford, England)* 19 (1): 124–28. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh043>.
- Olson, Sarah D., Susan S. Suarez, und Lisa J. Fauci. 2010. „A Model of CatSper Channel Mediated Calcium Dynamics in Mammalian Spermatozoa“. *Bulletin of Mathematical Biology* 72 (8): 1925–46. <https://doi.org/10.1007/s11538-010-9516-5>.
- Palermo, G D, C L O'Neill, S Chow, S Cheung, A Parrella, N Pereira, und Z Rosenwaks. 2017. „Intracytoplasmic sperm injection: state of the art in humans“. *Reproduction (Cambridge,*

England) 154 (6): F93–110. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0374>.

Palermo, G. D., P. N. Schlegel, L. T. Colombero, N. Zaninovic, F. Moy, und Z. Rosenwaks. 1996. „Aggressive Sperm Immobilization Prior to Intracytoplasmic Sperm Injection with Immature Spermatozoa Improves Fertilization and Pregnancy Rates“. *Human Reproduction (Oxford, England)* 11 (5): 1023–29.

Palermo, G., H. Joris, P. Devroey, und A. C. Van Steirteghem. 1992. „Induction of Acrosome Reaction in Human Spermatozoa Used for Subzonal Insemination“. *Human Reproduction (Oxford, England)* 7 (2): 248–54.

Palermo, Gianpiero D., Justin Kocent, Devin Monahan, Queenie V. Neri, und Zev Rosenwaks. 2014. „Treatment of Male Infertility“. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1154: 385–405. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0659-8_18.

Palermo, Gianpiero D., Queenie V. Neri, Takumi Takeuchi, und Zev Rosenwaks. 2009. „ICSI: Where We Have Been and Where We Are Going“. *Seminars in Reproductive Medicine* 27 (2): 191–201. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1202309>.

Palomar Rios, A., A. Gascón, J. V. Martínez, S. Balasch, und I. Molina Botella. 2018. „Sperm Preparation after Freezing Improves Motile Sperm Count, Motility, and Viability in Frozen-Thawed Sperm Compared with Sperm Preparation before Freezing-Thawing Process“. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 35 (2): 237–45. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1050-z>.

Petyim, Somsin, Chanon Neungton, Isarin Thanaboonyawat, Pitak Laokirkkiat, und ROUNGSIN Choavaratana. 2014. „Sperm Preparation before Freezing Improves Sperm Motility and Reduces Apoptosis in Post-Freezing-Thawing Sperm Compared with Post-Thawing Sperm Preparation“. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31 (12): 1673–80. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0332-y>.

Piasecka, Małgorzata, und Jerzy Kawiak. 2003. „Sperm Mitochondria of Patients with Normal Sperm Motility and with Asthenozoospermia: Morphological and Functional Study“. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 41 (3): 125–39.

Piomboni, P., R. Focarelli, A. Stendardi, A. Ferramosca, und V. Zara. 2012. „The Role of Mitochondria in Energy Production for Human Sperm Motility“. *International Journal of Andrology* 35 (2): 109–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x>.

Plessis, Stefan S du, Ashok Agarwal, Gayatri Mohanty, und Michelle van der Linde. 2015. „Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?“ *Asian Journal of Andrology* 17 (2): 230–35. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.135123>.

Polansky, F. F., und E. J. Lamb. 1988. „Do the Results of Semen Analysis Predict Future Fertility? A Survival Analysis Study“. *Fertility and Sterility* 49 (6): 1059–65. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)59961-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)59961-0).

Publicover, Stephen John, Laura Cecilia Giojalas, Maria Eugenia Teves, Gisela Sofia Mendes Machado de Oliveira, Aduen Andres Morales Garcia, Christopher Lowther Robert Barratt, und Claire Victoria Harper. 2008. „Ca²⁺ Signalling in the Control of Motility and Guidance in

Mammalian Sperm". *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (Mai): 5623–37. <https://doi.org/10.2741/3105>.

Qi, Huayu, Magdalene M. Moran, Betsy Navarro, Jayhong A. Chong, Grigory Krapivinsky, Luba Krapivinsky, Yuriy Kirichok, I. Scott Ramsey, Timothy A. Quill, und David E. Clapham. 2007. „All Four CatSper Ion Channel Proteins Are Required for Male Fertility and Sperm Cell Hyperactivated Motility“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (4): 1219–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610286104>.

Reeve, L., W. L. Ledger, und A. A. Pacey. 2003. „Does the Arg-Gly-Asp (RGD) Adhesion Sequence Play a Role in Mediating Sperm Interaction with the Human Endosalpinx?“ *Human Reproduction (Oxford, England)* 18 (7): 1461–68.

Remes Lenicov, F., A. Varese, A. Merlotti, J. Geffner, und A. Ceballos. 2014. „Prostaglandins in Semen Compromise the Immune Response against Sexually Transmitted Pathogens“. *Medical Hypotheses* 83 (2): 208–10. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.04.028>.

Ren, D., B. Navarro, G. Perez, A. C. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J. L. Tilly, und D. E. Clapham. 2001. „A Sperm Ion Channel Required for Sperm Motility and Male Fertility“. *Nature* 413 (6856): 603–9. <https://doi.org/10.1038/35098027>.

Rodriguez-Gil, J. E. 2006. „Mammalian Sperm Energy Resources Management and Survival during Conservation in Refrigeration“. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 41 Suppl 2 (Oktober): 11–20. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00765.x>.

Rodriguez-Martinez, H. 2007. „Role of the Oviduct in Sperm Capacitation“. *Theriogenology* 68 Suppl 1 (September): S138-146. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.018>.

Rogers, B. J., und S. D. Perreault. 1990. „Importance of Glycolysable Substrates for in Vitro Capacitation of Human Spermatozoa“. *Biology of Reproduction* 43 (6): 1064–69. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.6.1064>.

Roldan, E. R., J. Cassinello, T. Abaigar, und M. Gomendio. 1998. „Inbreeding, Fluctuating Asymmetry, and Ejaculate Quality in an Endangered Ungulate“. *Proceedings. Biological Sciences* 265 (1392): 243–48. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0288>.

Sengupta, P, E Borges, S Dutta, und E Krajewska-Kulak. 2018. „Decline in Sperm Count in European Men during the Past 50 Years“. *Human & Experimental Toxicology* 37 (3): 247–55. <https://doi.org/10.1177/0960327117703690>.

Sharkey, David J., Anne M. Macpherson, Kelton P. Tremellen, David G. Mottershead, Robert B. Gilchrist, und Sarah A. Robertson. 2012. „TGF- β Mediates Proinflammatory Seminal Fluid Signaling in Human Cervical Epithelial Cells“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (2): 1024–35. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200005>.

Simopoulou, Mara, Laertis Gkoles, Panagiotis Bakas, Polina Giannelou, Theodoros Kalampokas, Konstantinos Pantos, und Michael Koutsilieris. 2016. „Improving ICSI: A review from the spermatozoon perspective“. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 62 (6): 359–71. <https://doi.org/10.1080/19396368.2016.1229365>.

Stegg, J. W. van der, P. Steures, M. J. C. Eijkemans, J. D. F. Habbema, P. G. A. Hompes, F.

- J. Broekmans, H. J. H. M. van Dessel, u. a. 2007. „Pregnancy Is Predictable: A Large-Scale Prospective External Validation of the Prediction of Spontaneous Pregnancy in Subfertile Couples“. *Human Reproduction (Oxford, England)* 22 (2): 536–42. <https://doi.org/10.1093/humrep/del378>.
- Stegen, Çarcia, Minouche M. E. van Rumste, Ben Willem J. Mol, und Carolien A. M. Koks. 2012. „The Value of Chromosomal Analysis in Oligozoospermic Men“. *Fertility and Sterility* 98 (6): 1438–42. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.005>.
- Storey, Bayard T. 2004. „Mammalian Sperm Metabolism: Oxygen and Sugar, Friend and Foe“. *International Journal of Developmental Biology* 52 (5–6): 427–37. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072522bs>.
- Strünker, Timo, Normann Goodwin, Christoph Brenker, Nachiket D. Kashikar, Ingo Weyand, Reinhard Seifert, und U. Benjamin Kaupp. 2011. „The CatSper Channel Mediates Progesterone-Induced Ca²⁺ Influx in Human Sperm“. *Nature* 471 (7338): 382–86. <https://doi.org/10.1038/nature09769>.
- Suarez, S. S., und X. Dai. 1995. „Intracellular Calcium Reaches Different Levels of Elevation in Hyperactivated and Acrosome-Reacted Hamster Sperm“. *Molecular Reproduction and Development* 42 (3): 325–33. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080420310>.
- Suarez, S. S., und H. C. Ho. 2003. „Hyperactivation of Mammalian Sperm“. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 49 (3): 351–56.
- Suarez, S. S., und A. A. Pacey. 2006. „Sperm Transport in the Female Reproductive Tract“. *Human Reproduction Update* 12 (1): 23–37. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>.
- Suarez, S. S., I. Revah, M. Lo, und S. Kölle. 1998. „Bull Sperm Binding to Oviductal Epithelium Is Mediated by a Ca²⁺-Dependent Lectin on Sperm That Recognizes Lewis-a Trisaccharide“. *Biology of Reproduction* 59 (1): 39–44.
- Suarez, Susan S. 2002. „Formation of a Reservoir of Sperm in the Oviduct“. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 37 (3): 140–43.
- Suarez, Susan S. 2008. „Regulation of Sperm Storage and Movement in the Mammalian Oviduct“. *The International Journal of Developmental Biology* 52 (5–6): 455–62. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072527ss>.
- Suarez, Susan S. 2015. „Mammalian Sperm Interactions with the Female Reproductive Tract“. *Cell and Tissue Research*, Juli, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2244-2>.
- Suarez, Susan S. 2016. „Mammalian Sperm Interactions with the Female Reproductive Tract“. *Cell and tissue research* 363 (1): 185–94. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2244-2>.
- Sullivan, E. A., F. Zegers-Hochschild, R. Mansour, O. Ishihara, J. de Mouzon, K. G. Nygren, und G. D. Adamson. 2013. „International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) World Report: Assisted Reproductive Technology 2004“. *Human Reproduction (Oxford, England)* 28 (5): 1375–90. <https://doi.org/10.1093/humrep/det036>.
- Sun, Xiang-hong, Ying-ying Zhu, Lin Wang, Hong-ling Liu, Yong Ling, Zong-li Li, und Li-bo

- Sun. 2017. „The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review“. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 15 (August). <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0281-2>.
- Sun, Yangyang, Li Cheng, Yihua Gu, Aijie Xin, Bin Wu, Shumin Zhou, Shujuan Guo, u. a. 2016. „A Human Lectin Microarray for Sperm Surface Glycosylation Analysis“. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 15 (9): 2839–51. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.059311>.
- Sutovsky, P. 2015. „New Approaches to Boar Semen Evaluation, Processing and Improvement“. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 50 Suppl 2 (Juli): 11–19. <https://doi.org/10.1111/rda.12554>.
- Sutovsky, Peter, und Won-Hee Song. 2017. „Post-Fertilisation Sperm Mitophagy: The Tale of Mitochondrial Eve and Steve“. *Reproduction, Fertility, and Development* 30 (1): 56–63. <https://doi.org/10.1071/RD17364>.
- Tamburrino, L., S. Marchiani, E. Vicini, B. Muciaccia, M. Cambi, S. Pellegrini, G. Forti, M. Muratori, und E. Baldi. 2015. „Quantification of CatSper1 Expression in Human Spermatozoa and Relation to Functional Parameters“. *Human Reproduction (Oxford, England)* 30 (7): 1532–44. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev103>.
- Tao, Yong, Erika Sanger, Arpornrad Saewu, und Marie-Claude Leveille. 2020. „Human sperm vitrification: the state of the art“. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 18 (März). <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00580-5>.
- Teclé, Eillen, und Pascal Gagneux. 2015. „Sugar-Coated Sperm: Unraveling the Functions of the Mammalian Sperm Glycocalyx“. *Molecular Reproduction and Development* 82 (9): 635–50. <https://doi.org/10.1002/mrd.22500>.
- Templeton, A. A., I. Cooper, und R. W. Kelly. 1978. „Prostaglandin Concentrations in the Semen of Fertile Men“. *Journal of Reproduction and Fertility* 52 (1): 147–50.
- Thomas, P., und S. Meizel. 1988. „An Influx of Extracellular Calcium Is Required for Initiation of the Human Sperm Acrosome Reaction Induced by Human Follicular Fluid“. *Gamete Research* 20 (4): 397–411. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120200402>.
- Thompson, L. A., C. L. Barratt, A. E. Bolton, und I. D. Cooke. 1992. „The Leukocytic Reaction of the Human Uterine Cervix“. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* 28 (2): 85–89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1992.tb00765.x>.
- Tollner, T. L., A. I. Yudin, C. A. Treece, J. W. Overstreet, und G. N. Cherr. 2008. „Macaque Sperm Coating Protein DEFB126 Facilitates Sperm Penetration of Cervical Mucus“. *Human Reproduction* 23 (11): 2523–34. <https://doi.org/10.1093/humrep/den276>.
- Turner, Regina M. 2006. „Moving to the Beat: A Review of Mammalian Sperm Motility Regulation“. *Reproduction, Fertility, and Development* 18 (1–2): 25–38. <https://doi.org/10.1071/rd05120>.
- Valle-González, Elba R., Joshua A. Jackman, Bo Kyeong Yoon, Natalia Mokrzecka, und Nam-Joon Cho. 2020. „PH-Dependent Antibacterial Activity of Glycolic Acid: Implications for Anti-Acne Formulations“. *Scientific Reports* 10 (1): 7491. <https://doi.org/10.1038/s41598-020->

64545-9.

Varki, Ajit. 2011. „Since There Are PAMPs and DAMPs, There Must Be SAMPs? Glycan “Self-Associated Molecular Patterns” Dampen Innate Immunity, but Pathogens Can Mimic Them“. *Glycobiology* 21 (9): 1121–24.

Vicente-Carrillo, Alejandro, Manuel Álvarez-Rodríguez, und Heriberto Rodríguez-Martínez. 2017. „The CatSper Channel Modulates Boar Sperm Motility during Capacitation“. *Reproductive Biology* 17 (1): 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.01.001>.

Wagner, Andrea, Mahnaz Ekhlesi-Hundrieser, Christiane Hettel, Anna Petrunkina, Dagmar Waberski, Manfred Nimtz, und Edda Töpfer-Petersen. 2002. „Carbohydrate-Based Interactions of Oviductal Sperm Reservoir Formation-Studies in the Pig“. *Molecular Reproduction and Development* 61 (2): 249–57. <https://doi.org/10.1002/mrd.1154>.

Watson, P. F. 2000. „The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen“. *Animal Reproduction Science* 60–61 (Juli): 481–92. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3).

Wilcox, A. J., C. R. Weinberg, und D. D. Baird. 1995. „Timing of Sexual Intercourse in Relation to Ovulation. Effects on the Probability of Conception, Survival of the Pregnancy, and Sex of the Baby“. *The New England Journal of Medicine* 333 (23): 1517–21. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512073332301>.

Williams, Andrew C., und W. Christopher L. Ford. 2001. „The Role of Glucose in Supporting Motility and Capacitation in Human Spermatozoa“. *Journal of Andrology* 22 (4): 680–95. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02229.x>.

Xiao, Yan, Samuel P. Forry, Xiugong Gao, R. David Holbrook, William G. Telford, und Alessandro Tona. 2010. „Dynamics and Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake“. *Journal of Nanobiotechnology* 8 (Juni): 13. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-13>.

Xin, Ai-Jie, Li Cheng, Hua Diao, Peng Wang, Yi-Hua Gu, Bin Wu, Yan-Cheng Wu, u. a. 2014. „Comprehensive Profiling of Accessible Surface Glycans of Mammalian Sperm Using a Lectin Microarray“. *Clinical Proteomics* 11 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-10>.

Yeste, Marc, William V. Holt, Sergi Bonet, Joan E. Rodríguez-Gil, und Rhiannon E. Lloyd. 2014. „Viable and Morphologically Normal Boar Spermatozoa Alter the Expression of Heat-Shock Protein Genes in Oviductal Epithelial Cells during Co-Culture in Vitro“. *Molecular Reproduction and Development* 81 (9): 805–19. <https://doi.org/10.1002/mrd.22350>.

Zhou, Ji, Li Chen, Jie Li, Hongjun Li, Zhiwei Hong, Min Xie, Shengrong Chen, und Bing Yao. 2015. „The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation“. *PLoS ONE* 10 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132974>.

Anhang: Fragebogen und Einverständniserklärung zur Studie

Klinikum der Universität München · Urologische Klinik und Poliklinik
Prof. Dr. med. Christian Stief · Marchioninistraße 15 · 81377 München

Dr. med. Matthias Trottmann
matthias.trottmann@med.uni-muenchen.de

Susanne Bour (M.Sc.)
susanne.bour@med.uni-muenchen.de

www.klinikum-muenchen.de
Marchioninstr. 15
81377 München

Telefon: +49 (0)89 4400-74896
Telefax: +49 (0)89 7095-7884

Patienteninformation und Einverständniserklärung

Sehr geehrter Patient,

hiermit möchten wir Sie zur Teilnahme an unserer Studie

**„Untersuchung von molekularen Markern auf der Oberfläche der
Spermienplasmamembran für die andrologische Diagnostik“**

einladen.

1. Ziel der Studie

In Mitteleuropa ist jedes 6. Paar im fortpflanzungsfähigen Alter ungewollt kinderlos. Gründe dafür sind männliche oder weibliche Unfähigkeit zur Zeugung bzw. zur Empfängnis. Oft sind beim Mann nach Untersuchung des Spermas Spermien vorhanden, diese weisen jedoch eine deutlich verminderte Beweglichkeit und Lebensfähigkeit auf. Oft lassen sich aber auch die Ursachen der Zeugungsunfähigkeit nicht näher präzisieren – insbesondere, wenn die Standarduntersuchungen keine auffallenden Abweichungen erkennen lassen. Bisher werden vor allem das Aussehen und die Beweglichkeit der Spermien zur Spermienbeurteilung herangezogen. Es konnte aber gezeigt werden, dass das Aussehen der Spermien nur unzureichende Aussagen über die Befruchtungsfähigkeit der Spermien ermöglicht. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass eine vorherige Bindung der Spermien mit dem Eileitergewebe für die Befruchtung der Eizelle von Bedeutung ist. Eine **funktionelle Qualitätsbeurteilung** von Spermien beim Menschen in diesem Zusammenhang ist bisher nicht bekannt und könnte

bei der Beurteilung einer eingeschränkten Zeugungsfähigkeit sowohl diagnostisch als auch therapeutisch von Interesse sein.

Ziel dieser Studie ist es daher, erstmals die Grundlagen der Eileiter-Spermien-Interaktion beim Menschen zu untersuchen und einen neuen Test zur funktionellen Spermienbeurteilung zu etablieren.

2. Vorgehensweise

Im Rahmen dieser Studie wird Ihre Samenprobe verwendet, um mikroskopische, histochemische und molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen. Die Beurteilung Ihrer Probe durch das Laborpersonal erfolgt unabhängig von dieser Untersuchung und wird die bei Ihnen geplante Standarduntersuchung nicht beeinträchtigt.

3. Nutzen und Risiko

Als Studienteilnehmer genießen Sie eine besonders intensive Betreuung durch die Prüfarzte und haben immer dieselben, erfahrenen Ansprechpersonen. Sie erhalten – ohne dass Ihnen Kosten entstehen - zusätzliche wertvolle Informationen, die für die weitere Diagnostik und für die Entwicklung neuer erfolgreiche Therapiekonzepte wichtig sein können. Zudem leisten Sie einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden.

4. Datenbank

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über den Datenschutz und die ärztliche Schweigepflicht eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben; diese werden Ihnen auf Wunsch zusammen mit den Ergebnissen der Untersuchungen mitgeteilt. Anschließend werden die Daten gespeichert und durch Zuteilung einer Studiennummer verschlüsselt (pseudonymisiert), d. h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder Ihr Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Die Unterlagen werden 30 Jahre aufbewahrt. Die Daten werden pseudonymisiert und nicht anonymisiert, da die durch die neuen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse mit den Ergebnissen der routinemäßig durchgeführten Untersuchungen korreliert und Ihnen mitgeteilt werden sollen. Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Die Studie umfasst 200 Studienteilnehmer.

Wir wären Ihnen für Ihre Beteiligung an dieser Untersuchung sehr dankbar, selbstverständlich können Sie Ihre Teilnahme jederzeit widerrufen, ohne dass Ihnen daraus Nachteile entstehen. Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form weiterverwendet. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Dr. M. Trottmann, Susanne Bour (M.Sc.) und Rick Paschold (Doktorand der Urologischen Klinik). Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („**medizinische Gründe**“).

Es wird keine verschuldensunabhängige Versicherung abgeschlossen.

Bei Rückfragen zu der Studie erreichen Sie den Studienleiter unter der folgenden Telefonnummer:

Susanne Bour (M.Sc.), Klinik und Poliklinik für Urologie, Feodor-Lynen-Str. 19, 81377 München, Tel: 089-4400-74896

Dr. Matthias Trottmann, Klinik und Poliklinik für Urologie, Marchioninstr. 15, 81377 München, Tel: 089-4400-0

Rick Paschold, Klinik und Poliklinik für Urologie, Feodor-Lynen-Str. 19, 81377 München, Tel: 089-4400-74896

Ich erkläre hiermit, dass ich von (befugte Person) ausführlich über die Studie aufgeklärt und meine offenen Fragen beantwortet wurden. Ich erteile meine Zustimmung zur Speicherung meiner Daten unter Berücksichtigung des oben ausgeführten Datenschutzes.

Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift

Mit meiner Unterschrift erkläre ich mich bereit, an der genannten Studie teilzunehmen.

Ort, Datum, Unterschrift

Aufklärende Person, Ort, Datum, Unterschrift

Fragebogen zur Studie „Molekulare Marker auf der Oberfläche der Spermienplasmamembran“

Alter: _____

Größe (cm) _____ Gewicht (kg): _____

Relevante Vorerkrankung: erfolgte Chemotherapie bösartige
 Erkrankung
Hodenhochstand (beidseitig/einseitig?) Urogenitale
 Infektionen
Urogenitale Vor-OP Mumps –
 Infektionen
Bekannte genetische Auffälligkeiten
 Sonstige: _____

Nehmen Sie aktuell Medikamente? _____

Haben Sie Kinder? Nein Ja (wenn Ja, wie viele? Alter?)

Unerfüllter Kinderwunsch? Nein
 Ja, seit _____

Rauchen Sie? Nein
 Ja, seit _____
 Weniger als 15 Zigaretten/Tag
 Mehr als 15 Zigaretten/Tag
 Mehr als 30 Zigaretten/Tag

Ich habe vor _____ aufgehört. Davor waren es
(siehe Kästchen oben)

Besondere Bemerkungen: _____

Danksagung

Prof. Dr. med. Armin Becker

Vielen Lieben Dank für die immerwährende Unterstützung und den Zuspruch zu meinen Projekten von Ihrer Seite. Ich konnte immer auf Sie zählen und wurde in meiner Arbeit hervorragend betreut.

Prof. Dr. med. Christian Stief

Vielen Dank für die Unterstützung und auch die unkomplizierte Arbeitsplatzgestaltung auch während meines Studiums. Danke dass Sie diese Projekte und damit diese Arbeit möglich gemacht haben.

PD Dr. med. Matthias Trottmann

Ohne deine Unterstützung und deine Motivation wäre ich heute nicht da, wo ich angekommen bin, ich habe dir so vieles zu verdanken! Du hast mich auf den Weg in die Medizin gebracht und mir das alles ermöglicht.

Dr. med. Francisco Pan-Montojo und Yanina Dening

Ich danke euch beiden für die großartige Zeit miteinander und bin dankbar für die Freundschaft, die daraus entstand. Vielen lieben Dank für die Unterstützung im Labor und bei allen sonstigen Fragen und Problemen.

Rick Paschold

Ich danke dir von Herzen für die wunderbare – wenn auch manchmal aufreibende - Zeit im Labor und auch für die Freundschaft, deine Motivation für die experimentellen Arbeiten und die großartige Zusammenarbeit, die wir hatten!

Petra Bähring

Vielen Dank für die super Vorbereitung der Proben im Labor, deine Expertise und die lustigen Stunden die wir hatten.

Familie

Ihr habt mich immer in all meinen Vorhaben und meinem Weg hierhin vorbehaltlos unterstützt, ich danke euch sehr, dass ihr immer für mich da seid.

Fredy Keiser

Du hast mich auf dem letzten Stück begleitet, motiviert, bist ein wunderbarer Zuhörer und warst auch in schwierigen Zeiten immer an meiner Seite. Ich danke dir von Herzen dafür.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Bour, Susanne Nadine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Einfluss von Glykolsäure auf Spermien und andere molekulare Marker in der andrologischen Diagnostik

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Neuburg, den 21.11.2022
Ort, Datum

Susanne Bour
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationsliste

- DGU 2016 Abstract und Publikation „*Rolle von Glykokonjugaten bei humaner Infertilität*“
- EAU 2016 (London) Abstract “*The role of glycoconjugates in formation of the human sperm reservoir*”
- AUA 2017 (Boston) Abstract “*The Role of glycoconjugates in formation of the human sperm reservoir*”