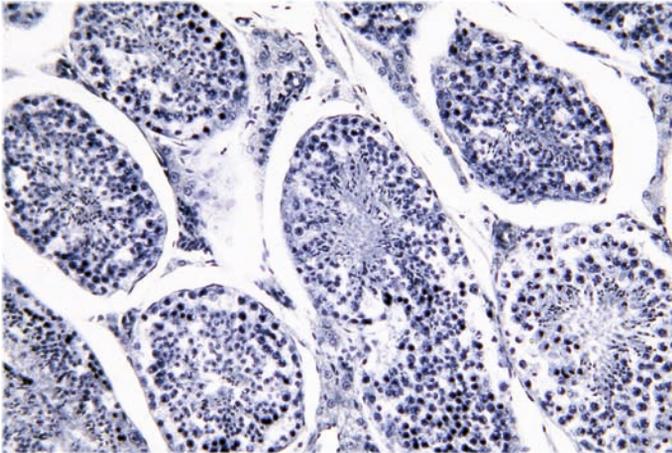


TATJANA PETRY

Nachweis von Autoantikörpern gegen
Disulfid-Isomerase ER-60 bei Männern mit
entzündlich bedingten Fertilitätsstörungen

eine Pilotstudie



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Nachweis von Autoantikörpern gegen Disulfid-Isomerase ER-60
bei Männern mit entzündlich bedingten Fertilitätsstörungen**

-

eine Pilotstudie

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Tatjana Petry

aus Gießen

Gießen 2012

Aus der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Weidner

Gutachter: Prof. Dr. H.- Chr. Schuppe

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Tag der Disputation: 29.10.2012

Teile der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht in:

M. Fijak, T. Zeller, T. Petry, J. Klug, E. Schneider, G. Haidl, J. Allam, A. Pilatz, W. Weidner, H. Schuppe, A. Meinhardt Auto-antibodies against disulphide isomerase ER-60 as a possible diagnostic marker in male immunological infertility, 4. DVR Kongress 9. – 12.2011, Berlin, J Reproduktionsmed Endokrinol 2011; 8(5):320.

M. Fijak, T. Petry, T. Zeller, G. Haidl, J. Allam, A. Pilatz, W. Weidner, A. Janetzko, H. Schuppe, A. Meinhardt Auto-Antibodies against disulphide isomerase ER-60 as a possible diagnostic marker in male immunological infertility, Annual Meeting of American Association for Clinical Chemistry, July 24-28, 2011 Atlanta, USA; Clinical Chemistry Abstract Supplement, Clinical Chemistry, Volume 57, Number S10, Page A121, October 2011.

M. Fijak, T. Petry, T. Zeller, G. Haidl, J.-P. Allam, A. Pilatz, W. Weidner, H.-C. Schuppe, A. Meinhardt (2011) Nachweis von Autoantikörpern gegen ER-60 bei Männern mit entzündlich bedingten Fertilitätsstörungen - eine Pilotstudie. Urologe 50 (Suppl 1): 29. Vortrag auf dem 63. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Hamburg, 14.-17.09.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	4
1.1 Funktionelle Organisation der Hoden	4
1.1.1 Das tubuläre Kompartiment.....	5
1.1.1.1 Peritubuläre Zellen	5
1.1.1.2 Sertoli-Zellen	5
1.1.1.3 Keimzellen	5
1.1.2 Das interstitielle Kompartiment.....	6
1.1.2.1 Leydig-Zellen.....	6
1.2 Immunzellen im Hoden.....	7
1.2.1 Makrophagen	7
1.2.2 Lymphozyten	8
1.2.3 Mastzellen.....	9
1.3 Immunprivileg des Hoden.....	10
1.3.1 Blut-Hoden-Schranke.....	10
1.4. Zytokine in der testikulären Immunoregulation	12
1.4.1 IL-1.....	12
1.4.2 TNF- α	12
1.4.3 MIF.....	12
1.4.4 TGF- β	13
1.5. Männliche Infertilität	14
1.6 Testikuläre Entzündungsreaktionen und Infertilität	16
1.7 Experimentelle Autoimmunorchitis.....	19
1.8 Diagnostik testikulärer Entzündungen.....	20
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1. Patienten	22
2.2 Materialien.....	26
2.2.1 Chemikalien.....	26
2.2.2 Antigene, Antikörper und Enzyme	26
2.2.3 Puffer und Lösungen	27
2.2.4 Verdünnungsreihen	28
2.2.5 Spezielle Verbrauchsmaterialien	29
2.2.6 Geräte	29
2.2.7 Software.....	29
2.3 Methoden.....	30
2.3.1 Gewinnung der Serumproben	30
2.3.2 Bereitstellung von ER-60	30
2.3.3 Testprinzip ELISA	31
2.3.3.1 Direkte und indirekte Assays	31
2.3.3.2 Kompetitive und nichtkompetitive Assays	32
2.3.4 Etablierung eines ELISA.....	36
2.3.4.1 Protokoll des etablierten ER-60-ELISA.....	39
2.3.4.2 Standardkurve und Berechnung der Testergebnisse	40
2.3.5 Statistik	41

3 Ergebnisse	42
3.1 Patienten- und Gruppendaten	42
3.1.1 Klinische Daten der untersuchten Probanden- und Patientengruppen.....	42
3.1.2 Anzahl und Alter in den Patientengruppen	44
3.1.3 Patientencharakteristika.....	45
3.2 Etablierung eines ELISA.....	49
3.2.1 Auswahl der Beschichtungskonzentration	49
3.2.2 Verdünnung des Standards	51
3.2.3 Verdünnung der Proben.....	51
3.3 Intra- und Inter-Assay-Variabilität des etablierten ELISA	53
3.4 Receiver Operating Characteristic Analyse	55
3.5 Ergebnisse und statistische Auswertung der Gruppen.....	58
3.5.1 Werte und Gruppenvergleich der unverdünnten Serumproben.....	58
3.5.2 Werte und Gruppenvergleich der verdünnten Serumproben.....	64
4 Diskussion	69
5 Zusammenfassung	76
6 Summary	77
7 Anhang	78
Abkürzungsverzeichnis.....	78
Abbildungsverzeichnis.....	80
Tabellenverzeichnis	81
Literaturverzeichnis	82
8 Ehrenwörtliche Erklärung	90
9 Danksagung	91

1 Einleitung

1.1 Funktionelle Organisation der Hoden

Der männliche Reproduktionstrakt hat zwei Hauptfunktionen zu erfüllen. Zu diesen zählen die Spermatogenese (Produktion der männlichen Gameten) und die Synthese der männlichen Geschlechtshormone (Steroidogenese), sowie deren Sekretion. Beide Vorgänge, Steroidogenese und Spermatogenese, finden in unterschiedlichen Kompartimenten des Hodens statt und sind dabei in morphologischer und funktioneller Hinsicht voneinander getrennt. Bei den verschiedenen Kompartimenten handelt es sich um das tubuläre Kompartiment, welches aus Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) besteht und um das interstitielle Kompartiment, welches zwischen den Samenkanälchen liegt (s. Abb. 1). Trotz dieser Trennung stehen die beiden Kompartimente in enger Beziehung zueinander. Dies ist für die qualitativ und quantitativ normale Produktion von Spermien Voraussetzung. Die Funktion der Hoden und ihrer Kompartimente werden vor allem von Strukturen des Zwischenhirns und der Hirnanhangsdrüse beeinflusst. Daneben wird die Funktion des Hodens aber auch durch lokale Steuerungsmechanismen gewährleistet [66].

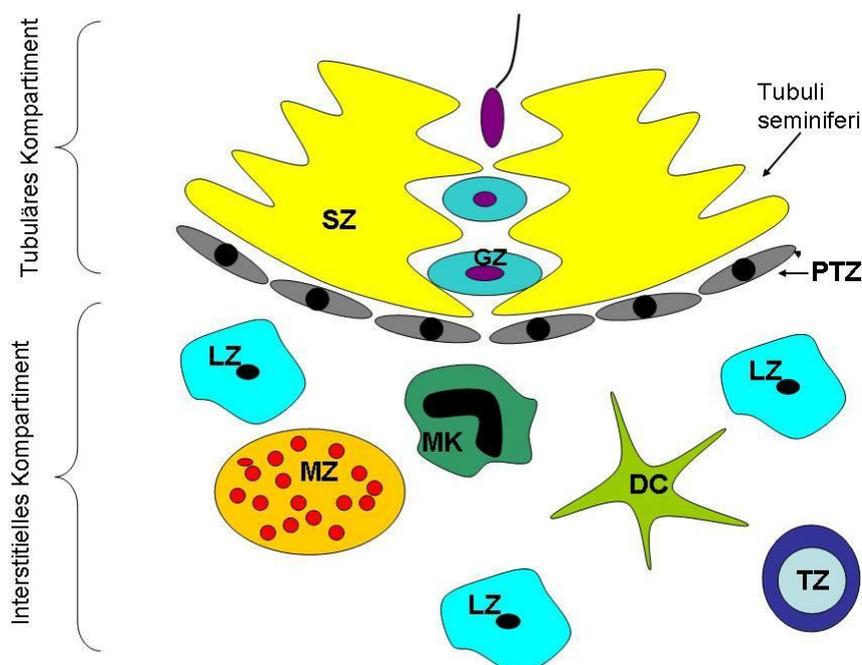


Abbildung 1. Morphologie des Hodens: Verschiedene Kompartimente und Zellen (GZ= Germinative Zelle, DC= Dendritische Zelle, LZ= Leydig-Zelle, MK= Makrophage, MZ= Mastzelle, PTZ= Peritubuläre Zellen, SZ= Sertoli-Zelle, TZ= T-Zelle)

1.1.1 Das tubuläre Kompartiment

Das tubuläre Kompartiment nimmt einen Anteil von ca. 70% des Hodenvolumens ein. Hier findet die Spermatogenese statt und es besteht aus Keimzellen, peritubulären Zellen und Sertoli-Zellen. Außerdem finden sich im Hoden noch Bindegewebssepten, welche diesen in etwa 300 Lobuli teilen. In jedem Lobulus finden sich ein bis drei stark aufgeknauelte Samenkanälchen, welche jeweils eine Länge von etwa 30-80cm aufweisen [66].

1.1.1.1 Peritubuläre Zellen

Bei den als peritubulären Zellen bezeichneten Zellen handelt es sich um Myofibroblasten, welche geringgradig differenzierte Myozyten mit der Fähigkeit zur spontanen Kontraktion darstellen. Die peritubulären Zellen bilden mehrere (bis zu sechs) konzentrische Lagen um den Tubulus. Es werden verschiedene Faktoren von den peritubulären Zellen produziert, welche einen Einfluss auf die Kontraktilität der Zellen haben. Diese Faktoren sind unter anderem Panaktin, Desmin, Gelsolin, glattes Muskelfasermysin und glattes Muskelfaseraktin. Des Weiteren wird extrazelluläre Matrix, Vimentin und Fibroblastenprotein gebildet [42].

1.1.1.2 Sertoli-Zellen

Sertoli-Zellen stellen etwa 30-40% des Keimepithelvolumens und sitzen dort der Basalmembran auf. Sie haben zytoplasmatische Fortsätze, welche bis zum Lumen reichen und somit das Stützgerüst des Keimepithels bilden.

Es werden verschiedene Faktoren wie Proteine, Wachstumsfaktoren, Steroide, Zytokine, Proteine, Opioide etc. in den Sertoli-Zellen synthetisiert und sezerniert. Den Sertoli-Zellen kommt die Rolle als Versorger der Keimzellen zu, wobei dies über selektiven Transport, Transzytose und vektorielle Sekretion geschieht.

Auch Hodengröße und Quantität der Spermienproduktion im adulten Hoden sind abhängig von Sertoli-Zellen [66, 98].

1.1.1.3 Keimzellen

Der Prozess der Spermatogenese beginnt mit der Teilung von Stammzellen und resultiert in der Bildung von Spermatozoen. Die unterschiedlichen Keimzellen sind innerhalb der Samenkanälchen in charakteristischen Zellassoziationen angeordnet, die als Stadien der Spermatogenese bezeichnet werden.

Die Keimzellen starten als Spermatogonien und liegen basal dem Keimepithel auf. Aus den Spermatogonien entstehen die präleptotänen Spermatozyten unmittelbar vor dem

Beginn der meiotischen Reifeteilung. Die Keimzellen beginnen mit der DNA-Synthese. Tetraploide Keimzellen werden als Spermatozyten bezeichnet und durchlaufen die Phasen der meiotischen Reifeteilung. Aus der Reifeteilung gehen haploide Keimzellen hervor, die Spermatiden. Diese sind runde und teilungsinaktive Zellen und durchlaufen eine Transformation, aus welcher ausdifferenzierte und elongierte Spermatozoen hervorgehen. Anschließend kommt es zur Freisetzung der Spermatozoen in das Tubuluslumen [66].

1.1.2 Das interstitielle Kompartiment

Im interstitiellen Kompartiment finden sich Leydig-Zellen, Zellen des Immunsystems, lockeres Bindegewebe, Nerven, Blut- und Lymphgefäße.

1.1.2.1 Leydig-Zellen

Die Leydig-Zellen synthetisieren und sezernieren das männliche Geschlechtshormon Testosteron und sind somit der bedeutendste Zelltyp des interstitiellen Kompartiments. Es sind ca. 200×10^6 Leydig-Zellen im menschlichen Hoden enthalten, die etwa 10-20% dieses Kompartiments ausmachen [73].

Die adulten Leydig-Zellen weisen die typischen zytoplasmatischen Charakteristika einer Steroidhormon-produzierenden Zelle auf. Des Weiteren finden sich im Zytoplasma der adulten Leydig-Zelle Lipofuszingranula und Lipidtröpfchen, in welchen die Vorstufen des Testosterons enthalten sind. Gelegentlich sind auch Reinke-Kristalle in den Leydig-Zellen zu finden. Im adulten Hoden unterliegt die Proliferationsrate der Leydig-Zellen, welche sehr niedrig ist, der Steuerung durch Lutenisierendes Hormon (LH). Ebenfalls wird die Differenzierung der intertubulär und peritubulär gelegenen Myofibroblasten zu Leydig-Zellen durch LH induziert.

Neben dem adulten Zelltyp der Leydig-Zelle findet sich die immature Leydig-Zelle. Dieser Zelltyp kommt allerdings sehr selten vor und seine Funktion ist noch nicht endgültig geklärt. Es wird aus Experimenten am Tiermodell eine Art Reservefunktion für adulte Leydig-Zellen vermutet [41, 66].

1.2 Immunzellen im Hoden

Unter physiologischen Umständen ist eine beachtliche Anzahl von Immunzellen im adulten Hoden zu finden [19,20]. Die Immunzellen sind im interstitiellen Kompartiment lokalisiert und sind dort an den Mechanismen beteiligt, welche zur Ausbildung des Immunprivileg im Hoden führen.

Makrophagen stellen nach den Leydig-Zellen den zweithäufigsten Zelltyp im interstitiellen Kompartiment dar. Hierbei findet man pro 10-50 Leydig-Zellen etwa einen Makrophagen.

Neben lokalen Makrophagen und Leydig-Zellen werden auch Mastzellen regelmäßig im interstitiellen Gewebe und peritubulärem Gewebe gefunden [27, 59, 67]. Die Anzahl der Lymphozyten im Hoden ist relativ gering, obwohl die zirkulierenden Immunzellen Zugang zu dem Organ haben [33, 60].

Es liegen keine einheitlichen Daten über dendritische Zellen, sowie Natürliche Killer (NK)- Zellen im menschlichen Hoden vor. Unter physiologischen Umständen werden weder lokale, noch zirkulierende Immunzellen in den Tubuli seminiferi beschrieben. Polymorphkernige Leukozyten fehlen hier komplett [83].

Allerdings konnte festgestellt werden, dass im normalen Rattenhoden dendritische Zellen zu finden sind, wenn auch in einer geringeren Anzahl als Makrophagen [76]. Dendritische Zellen als professionelle antigenpräsentierende Zellen im nicht-entzündlichen adulten Rattenhoden exprimieren kostimulatorische Moleküle, welche an der T-Zellaktivierung beteiligt sind, wie zum Beispiel CD80 und CD86 [76]. Den Zellen des Immunsystems, welche sich im Interstitium des gesunden, adulten Hodens finden, wird vor allem eine regulatorische Funktion zugesprochen [34, 35]. Es konnte trotz des immunprivilegierten Status des Hodens keine erhöhte Empfänglichkeit für Infektionen oder Tumoren nachgewiesen werden [25, 46].

1.2.1 Makrophagen

Die testikulären residenten Makrophagen befinden sich im interstitiellen Kompartiment des Hodens. Makrophagen stellen morphologisch und funktionell eine heterogene Zellpopulation dar. Sie sind an der Gewebshomöostase und Entzündungsreaktionen beteiligt [47, 57, 59]. Sie üben verschiedene Funktionen aus wie Phagozytose, Antigenpräsentation, zytotoxische Aktivität, Sekretion von Zytokinen und Beeinflussung des Bindegewebsstoffwechsels und gewebsspezifischer Aktivitäten.

Dabei sind testikuläre Makrophagen und ihre Funktionen in hohem Maße durch das lokale Umfeld bestimmt [33, 35].

Die Anzahl der Makrophagen erhöht sich während der Pubertät und ist dabei teilweise abhängig von der Interaktion mit Leydig-Zellen [35]. Testikuläre Makrophagen können in der Gonade bereits in der 7. Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss von hCG kommt es postnatal zur Proliferation der Makrophagen und sie machen im adulten menschlichen Hoden etwa 25% der Zellen des Interstitiums aus.

An der Regulation von Spermatogenese und Steroidogenese sind testikuläre Makrophagen ebenfalls beteiligt [26, 35, 37, 83]. Dabei haben residente Makrophagen einen trophischen Effekt auf die Leydig-Zell-Steroidogenese. Neben den Testes-spezifischen Einflüssen fungieren die residenten Makrophagen im Hoden als potentielle Effektorzellen in der Immunabwehr. Es konnte aufgezeigt werden, dass testikuläre Makrophagen MHC II-Moleküle exprimieren, welche zur Antigenpräsentation für CD4⁺ T-Zellen notwendig sind [90]. Vorhandene Daten weisen auf eine Erhöhung der entzündungshemmenden Zytokine im Maushoden hin, so dass ortsansässige Makrophagen im Hoden eine hauptsächlich anti- inflammatorische Aktivität ausüben. Die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1 und TNF α ist zwar herabgesetzt, jedoch vorhanden, so dass der Hoden dennoch in der Lage ist auf Infektionen mit Inflammation zu reagieren [21, 44, 66].

Im Rattenhoden sind zwei unterschiedliche Makrophagenpopulationen bekannt. Diese unterscheidet man anhand ihrer verschiedenen Oberflächenmoleküle und ihren unterschiedlichen Auswirkungen auf die Immunantwort. Dabei scheinen ED2⁺-Makrophagen in der Immunregulation eine Rolle zu spielen und nicht zur Entzündungsreaktion beizutragen, dagegen wirken die ED1⁺ED2⁻-Zellen aktivierend auf Entzündungsprozesse. Im Rahmen einer akuten oder chronischen Entzündung kommt es zu einer verstärkten Zuwanderung von ED1⁺-Makrophagen durch Blutgefäße [21, 35].

1.2.2 Lymphozyten

Im normalen und gesunden Hoden der Ratte konnte nachgewiesen werden, dass circa 15% der immunkompetenten Zellen Lymphozyten und NK- Zellen sind (15). Bei den T-Lymphozyten kommen überwiegend CD8⁺-Gedächtniszellen vor, B-Lymphozyten konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. T-Lymphozyten scheinen eine wichtige

Rolle in der Pathogenese der männlichen Infertilität bei infektiösen bzw. entzündlichen Erkrankungen des Hodens zu spielen [36, 80].

Es liegen nur wenige Daten über Lymphozyten und deren Vorkommen im gesunden, menschlichen Hoden vor. Es konnten immunhistologisch jedoch CD4⁺- und CD8⁺- T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Diese befanden sich vor allem im Bereich des Rete testis. B-Lymphozyten konnten allerdings nicht gefunden werden [19, 45, 74, 95]. Hinsichtlich der Lymphozytenfunktionen und deren Subpopulationen liegen wenige Daten vor, aber es wird eine regulatorische Funktion unter physiologischen Bedingungen im Hoden angenommen. Duan et al. [17, 67] beschreiben erst kürzlich eine erhöhte Anzahl und Expression vom Subtyp 17 der T-Helfer (TH) -Zellen und deren Zytokinen bei Patienten mit Azoospermie im chronisch entzündeten Hodengewebe.

1.2.3 Mastzellen

Mastzellen finden sich im menschlichen, adulten Hoden im Interstitium und in der Lamina propria der Tubuli seminiferi, sowie in der Tunica albuginea [47, 57, 67].

Die genaue Funktion von Mastzellen im menschlichen adulten Hoden konnte bisher noch nicht genau geklärt werden. Sie sind jedoch ähnlich wie Makrophagen an der komplexen Regulation der Hodenfunktion beteiligt [34].

Sie nehmen zudem an den Reaktionen des angeborenen, unspezifischen und des erworbenen, spezifischen Immunsystems teil. Dabei setzen sie eine Reihe von Entzündungsmediatoren, wie Histamin, Heparin, Proteasen (Chymase, Tryptase), Leukotriene und Zytokine frei [46]. Hierbei kann man Mastzellen anhand ihrer Proteasensynthese einteilen, in Tryptase/Chymase- und Tryptase-synthetisierende Mastzellen. Beide Formen kommen im Hoden und Nebenhoden vor [24, 67]. Die Freisetzung von Tryptase durch Mastzellen scheint im Zusammenhang mit fibrotischen Umwandlungen bei infertilen Männern zu stehen [3, 57], sowie eine erhöhte Anzahl von Mastzellen auch in der Pathophysiologie von testikulären Störungen eine Schlüsselrolle zu spielen scheinen [47, 59].

In den ersten Lebensjahren ist ein Anstieg der Mastzellen im peripheren Hodengewebe zu beobachten. Die Anzahl der Mastzellen im menschlichen Hoden vor der Pubertät ist gering, steigt jedoch während der Pubertät an [67].

1.3 Immunprivileg des Hoden

Ein Immunprivileg ist eine evolutionäre Adaptation, um besonders vulnerable Gewebe mit wenig Kapazität zur Regeneration zu schützen und damit deren Funktionsverlust zu verhindern [25, 35].

Das Immunprivileg des Hoden verhindert Immunreaktionen gegen potentielle Autoantigene. Die meiotischen und haploiden männlichen Keimzellen exprimieren während der Pubertät erstmals eine Reihe von besonderen Antigenen. Dies geschieht lange nach der Reifung des Immunsystems und Ausbildung von systemischer Selbsttoleranz [24].

Eine Vielzahl von Experimenten weisen daraufhin, dass nicht nur Keimzellen, sondern auch Fremdgewebetransplantate im Hoden vor Autoimmunattacken geschützt werden [32, 33]. Dabei spielen physiologische, wie auch immunologische Faktoren eine entscheidende Rolle für die Schaffung und Aufrechterhaltung des Immunprivilegs des Hoden. Zytokine sind an den komplexen Interaktionen zwischen testikulären somatischen Zellen und ortsständigen, sowie zirkulierenden Immunzellen beteiligt. Ungeachtet des immunprivilegierten Status kann der Hoden eine effektive Immunantwort gegen virale und bakterielle Infektionen, Neoplasien oder chemische Noxen suggerieren. Zudem können keimzellspezifische Antigene zum Ziel von heftigen Autoimmunreaktionen werden, wenn spezifische T-Lymphozyten durch aktive Immunisierung generiert werden. Ähnliche Mechanismen von T-Zell-gesteuerter Autoimmunität könnten auch chronisch inflammatorische Vorgänge im männlichen Hoden erklären [83].

1.3.1 Blut-Hoden-Schranke

Die Blut-Hoden-Schranke entsteht während der Pubertät mit dem Auftreten erster meiotischer Keimzellen. Sie wird durch Zonula occludentes („tight junctions“) zwischen den Sertoli-Zellen aufgebaut. Die Blut-Hoden-Schranke trennt das basale Kompartiment des Epitheliums der Tubuli seminiferi, welches Spermatogonien und Spermatozyten im Präleptotänstadium enthält, vom adluminalen Kompartiment, in welchem Spermio-genese und Meiose stattfinden [54, 71]. Die Tight junctions zwischen den Sertoli-Zellen sind selbst für kleine Moleküle impermeabel. Das adluminale Kompartiment ist so von dem vaskulären System und zirkulierenden Immunzellen

getrennt. Diese Abtrennung von keimzell-spezifischen Autoantigenen durch die Blut-Hoden-Schranke funktioniert jedoch nicht vollständig [78, 83, 96].

Die unzureichende Sequestration von Antigenen oder ganzer Keimzellen durch die Blut-Hoden-Schranke beim Mann führt zur Entwicklung von Anti-Spermatozoen-Antikörper (ASA). Kommen die während der Reifung der Spermatogenese entstehenden keimzellspezifischen Antigene mit immunkompetenten Zellen in Kontakt, können ASA entstehen [15, 16]. Störungen der Blut-Hoden-Schranke können anlagebedingt sein oder traumatisch entstehen.

1.4. Zytokine in der testikulären Immunoregulation

Die Regulation der Steroidogenese und Spermatogenese innerhalb des Hodens ist abhängig von zahlreichen autokrinen und parakrinen Mediatoren einschließlich Wachstumsfaktoren und Zytokinen [37, 79]. Ortsansässige Makrophagen und testikuläre somatische Zellen produzieren unter physiologischen Umständen eine Reihe von Zytokinen, wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-10, Interferone, Makrophagen-Inhibitionsfaktor (MIF) und Mitglieder der Transforming growth Faktor (TGF)- β -Familie [37]. Die scheinbare Überschneidung zwischen testikulären und immunregulatorischen Funktionen der Zytokine könnte ein Ansatz sein, um das Immunprivileg des Hodens und der entzündungsvermittelten Zerstörung im Hoden zu verstehen [24, 83].

1.4.1 IL-1

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 wird von aktivierten Makrophagen sezerniert, kann aber auch in anderen Zelltypen induziert werden [46]. Es gibt Hinweise darauf, dass auch Spermatozyten und Spermatisden konstitutiv IL-1 produzieren [1]. In den Tubuli seminiferi der Ratte stimuliert IL-1 die spermatogoniale und präleptotene Spermatozyten-DNA-Synthese [70]. Diese Abläufe deuten daraufhin, dass testikuläres IL-1 eine Rolle in der Koordination von Sertoli- und Keimzellentwicklung in den Tubuli seminiferi, sowie bei der Kontrolle der Steroidogenese spielen könnte.

1.4.2 TNF- α

Beobachtungen in menschlichen Hoden deuten daraufhin, dass TNF- α eine Rolle bei der Kontrolle der Effizienz der Spermatogenese spielt. Dabei soll TNF- α die Apoptose männlicher Keimzellen durch Regulation des FasL inhibieren [72]. In Bezug auf die Immunpathologie des Hodens stellt TNF- α eines der hauptverursachenden Agenzien in der Entwicklung der Autoimmunorchitis dar [86, 97].

1.4.3 MIF

MIF ist ein pleiotropes Protein und kommt in vielen Geweben vor. Es ist an inflammatorischen Reaktionen beteiligt und als Gegenregulator der Glukokortikoid-induzierten Immunsuppression tätig [37]. Ergebnisse aus Studien an Rattenhoden stützen die Vermutung, dass MIF eine Rolle in der parakrinen Regulation zwischen Leydig-Zellen und Tubuli seminiferi spielt. Es konnte gezeigt werden, dass MIF zu einer Herunterregulierung der TGF- β 2-Sekretion in peritubulären Zellen führt.

Demzufolge kann die Hochregulierung des proinflammatorischen MIF während einer Entzündungsreaktion die immunsuppressive Antwort des Hodens inhibieren [63].

1.4.4 TGF- β

Die Mitglieder der TGF- β -Familie sind dimerische Zytokine, welche überwiegend an immunsuppressiven und antiinflammatorischen Aktivitäten mitwirken [46]. Es wurden bislang drei verschiedene Typen, die sich sehr ähnlich sind (TGF- β 1 bis 3), bei Säugetieren identifiziert. Diese werden vor allem von Sertoli-Zellen, peritubulären Zellen und Leydig-Zellen im fötalen und unreifen Hoden exprimiert. Postpubertär lässt die Produktion von TGF- β dramatisch nach [62]. Die zugehörigen Rezeptoren für TGF- β finden sich in somatischen Zellen und in Keimzellen [9, 28]. Diese Zytokine wurden in Zusammenhang mit der Kontrolle von Leydig Zell- und Tubuli seminiferi-Entwicklung gebracht [37]. Eine genaue Funktion im adulten Hoden muss noch ermittelt werden, obgleich TGF- β eine Rolle bei der Immunaktivität von Sertoli-Zellen und dem testikulären Immunprivileg zugeschrieben wird [25].

1.5. Männliche Infertilität

Die WHO rechnet weltweit mit einem Zuwachs von ca. zwei Millionen infertilen Paaren. Für die Industrienationen wird eine durchschnittliche Prävalenz der männlichen Infertilität von 14% angenommen [7, 64]. Bei der Hälfte der ungewollt kinderlosen Paare finden sich Fertilitätsstörungen beim Mann [50].

Nieschlag und andere Autoren definieren Infertilität im Sinne jedweder Störung der Fertilität [66, 77]. Eine Einschränkung der Fertilität liegt vor, wenn bei ungeschütztem, regelmäßigem Geschlechtsverkehr innerhalb eines Jahres keine Schwangerschaft eintritt. Hierbei werden primäre und sekundäre Infertilität unterschieden. Wobei primäre Infertilität eines Paares bedeutet, dass es bisher noch zu keiner Schwangerschaft in der Partnerschaft kam, und sekundäre Infertilität ausdrückt, dass bereits mindestens eine Schwangerschaft bestand.

Die Ursachen für männliche Infertilität sind auf den verschiedensten Ebenen lokalisiert. Es können die Testes selber betroffen sein, aber auch Störungen in den ableitenden Samenwegen, den akzessorischen Geschlechtsdrüsen oder der Samendeposition vorliegen. Des Weiteren können auch die übergeordneten Zentren wie Hypothalamus und Hypophyse oder die Androgen-Zielorgane betroffen sein. Neben dieser Einteilung müssen auch andere Faktoren, wie allgemeine oder psychische Erkrankungen, Toxine, Umweltfaktoren und immunologische Störungen der Fertilität berücksichtigt werden [66]. Unter immunologischer Infertilität versteht man das Ausbleiben einer Konzeption als Folge von Störungen des Immunsystems im Bereich der reproduktiven Organe. Der Hauptteil dieser Störungen ist auf das Vorliegen von Antispermatozoen-Antikörpern (ASA) zurückzuführen. In der Literatur werden Häufigkeiten von ASA von bis zu 12% bei Patienten aus Infertilitätssprechstunden angegeben [11, 93].

Die ätiologischen Faktoren bei männlichen Fertilitätsstörungen nach de Kretser [12] werden in Tabelle 1 aufgezeigt.

Tabelle 1: Ätiologische Faktoren bei männlichen Fertilitätsstörungen (nach de Kretser [12])

Lokalisation	Art der Störung	Krankheitsbilder/ Beispiele
Prätestikulär	Endokrin	Hypogonadotroper Hypogonadismus
Testikulär	Genetisch determiniert Kongenital Infekt-bedingt Spermatogeneseschädigende Faktoren Vaskulär bedingt Idiopathisch	Klinefelter- Syndrom Maldescensus testis Orchitis Genussgifte, Zytostatika, Pharmaka, Hitze, ionisierende Strahlen Torsion, Varikozele
Posttestikulär	Obstruktion Nebenhoden Obstruktion Vas deferens Nebenhodenfunktionsstörung Spermatozoen-Antikörper	Kongenital; Infektion, Trauma Genetisch: Zystische Fibrose Erworben: Vasektomie Epididymale Asthenoteratozoospermie Nach Vasektomie, Trauma, Torsion, Infektionen
Samendeposition	Erektile Dysfunktion Ejakulationsstörung Hypospadie, Phimose, Penisdeformationen	Psychosexuell, endokrin, neurogen, vaskulär, pharmaka- induziert Psychosexuell, neurogen, pharmaka- induziert, nach lokaler Chirurgie

1.6 Testikuläre Entzündungsreaktionen und Infertilität

Infektion und Inflammation des Reproduktionstraktes sind allgemein anerkannte Faktoren der männlichen Infertilität und werden zu den wichtigsten Ursachen der Infertilität beim Mann gezählt [13, 14, 30, 66].

Es können im Hoden, trotz der besonderen Bedingungen der lokalen Immunregulation, immunopathologische Reaktionen auftreten. Während die akuten Formen der Orchitis bzw. Epididymo-Orchitis meist durch Schmerzen, Fieber und andere subjektive Beschwerden der Patienten auffallen, verlaufen die chronischen Entzündungen klinisch oft stumm. Dabei ist eine alleinige Entzündung des Hodens (Orchitis) selten, häufiger wird sie gemeinsam mit einer Epididymitis, als Epididymo-Orchitis (Entzündung der Hoden und Nebenhoden) beobachtet [30, 38, 61].

Testikuläre Entzündungserscheinungen als eine Komplikation einer akuten Epididymitis durch aufsteigende bakterielle Infektionen sind häufig und können bei bis zu 60% dieser Patienten auftreten [53, 92]. In der Gruppe von Männern unter dem 35. Lebensjahr sind sexuell übertragbare Erreger, wie Chlamydia trachomatis und Neisseria gonorrhoeae vorherrschend. Bei älteren Männern treten eher Harnwegsinfektionen durch E. coli in den Vordergrund [69, 91].

Eine Orchitis kann sich im Rahmen einer systemischen, vor allem einer viralen Infektion, entwickeln und ist die häufigste Komplikation von Mumps bei Männern in der Pubertät oder postpubertär. Es gibt noch andere mögliche virale Infektionen, wie zum Beispiel: Coxsackie-Virus, Epstein-Barr-Virus oder Influenza-Viren, die mit einer Orchitis assoziiert sein können [61, 75, 81].

Histologisch findet sich bei einer bakteriell bedingten, akuten Orchitis eine massive Infiltration der Tubuli seminiferi und des Interstitiums mit neutrophilen Granulozyten. Dahingegen findet man bei der viralen Orchitis multifokale perivaskuläre und peri- bis intratubuläre Infiltrate mit neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen [30, 38, 81]. Der Keimepithelverband der Tubuli im Entzündungsgebiet kann sich dabei vollständig auflösen und häufig bleiben nur einzelne Spermatogonien zwischen den erhaltenen Sertoli-Zellen übrig. Im Verlauf kann es zu einer Tubulusfibrose kommen.

Subakute bzw. chronische asymptomatische Entzündungen des Hoden und deren Folgen bleiben weiterhin unklar. Es gibt wenige Studien, welche testikuläre Entzündungsreaktionen bei infertilen Männern untersucht haben. Dabei ist von einer hohen Rate an asymptomatisch verlaufenden und lediglich histologisch nachweisbarer

Prozesse auszugehen [30, 38, 61, 84]. Die ermittelte Prävalenz von inflammatorischen Infiltraten in Hodenbiopsien wird mit 4.8-16.6% angegeben [40, 45, 87]. In einer systematischen Nachuntersuchung der Gewebeproben von asymptomatischen Patienten mit Fertilitätseinschränkungen konnte gezeigt werden, dass in über 50% der Fälle eine testikuläre Infiltration mit Lymphozyten vorlag [84]. Die Einwanderung von nicht residenten Immunzellen in das Hodengewebe stellt eine lokale Aktivierung des Immunsystems dar. Die einwandernden Immunzellen unterliegen hier scheinbar nicht den Kontrollmechanismen des Immunprivilegs [34]. Hinweise dafür liefern die Beobachtungen, dass nach akuten viralen und bakteriellen Orchitiden multifokale lymphozytäre Infiltrate zu finden sind [2, 38, 61]. Die Infiltration von Lymphozyten in das Hodengewebe von Männern mit Fertilitätsstörungen ist als Imbalance der lokalen Immunregulation zu sehen [84]. Histopathologisch konnten einzelne Lymphozyten, jedoch auch dichte Infiltrate (peritubulär und perivaskulär), welche fokal oder multifokal verteilt waren, nachgewiesen werden. Ähnlich wie in Tiermodellen fanden sich bei Infertilitätspatienten hauptsächlich aktivierte T-Lymphozyten, vor allem CD4⁺- und CD8⁺-T- Zellen, welche von einer erhöhten Zahl von nicht- ortsansässigen CD68⁺- Makrophagen und Mastzellen begleitet wurden [19, 43, 84]. Vorherrschende peritubuläre Lokalisation der Lymphozyten und charakteristische morphologische Veränderungen der Tubuli seminiferi, ähnelnd der experimentellen Autoimmunorchitis (EAO), unterstützen das Konzept, dass es zu einer begleitenden Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen kommt [80]. Bei chronischen Entzündungsreaktionen weist das histologische Bild morphologische Charakteristika der EAO auf [2]. In den meisten Fällen bleiben die Leydig-Zellen erhalten, jedoch kann es bei ausgedehnten Prozessen auch zu einer Beeinträchtigung der endokrinen Hodenfunktion kommen [1, 30]. In früheren Studien wurde bereits auf Autoimmunreaktionen im Hoden hingewiesen [2, 40, 61, 87]. Andrada et al. [2] und Hedger [34] gehen von einer Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten im Rahmen einer testikulären Entzündungsreaktion aus (Abb.2).

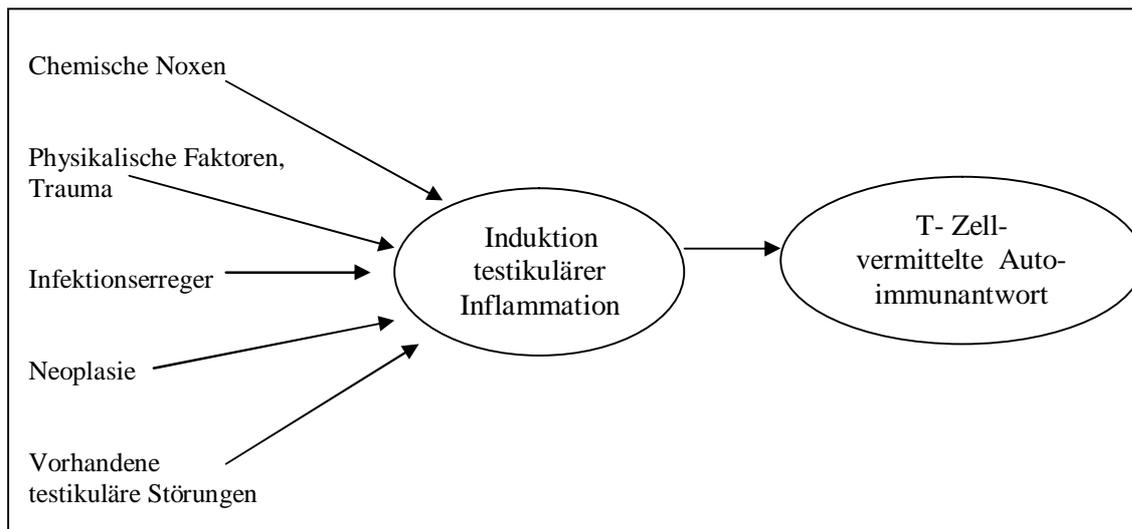


Abbildung 2. Ätiologische Faktoren und Pathogenese der chronischen, asymptomatischen Inflammation im humanen Hoden-eine Hypothese (modifiziert von Schuppe & Meinhardt, 2005)

Es ist unwahrscheinlich, dass eine Verschlechterung der Spermatogenese durch direkte T-Zell-vermittelte Zytotoxizität zustande kommt, sondern eher eine Dysbalance von lokal produzierten Zytokinen hin zu einem pro-inflammatorischen Profil darstellt. Infolgedessen scheint eine Schädigung der Sertoli-Zellfunktion und ein nachfolgender Zusammenbruch der Blut-Hoden-Schranke ein wichtiger Faktor bei testikulären Entzündungsreaktionen zu sein [25]. Erhöhte Level von TNF- α und TGF- β , welche in Hodenentzündungen gefunden wurden [37], haben einen störenden Einfluss auf die Anordnung der 'tight junctions' in Sertoli-Zellen, möglicherweise über eine Herunterregulierung der Occludin-Expression [56, 85].

Infektionen und Entzündungen des Genitaltraktes gelten als mögliche Ursache für die Induktion von Autoantikörpern gegen Spermatozoen [6, 58]. Jedoch konnten bei Männern mit testikulären Entzündungsreaktionen und nach Mumpsorchitis nur in wenigen Fällen erhöhte Spermatozoenantikörper nachgewiesen werden [48, 84]. Bis heute gibt es wenige Beweise für eine enge Beziehung zwischen testikulären Entzündungsreaktionen und einer Formation von Autoantikörpern gegen Spermatozoen beim Menschen. Andererseits konnte Immunreaktivität gegen testikuläre Autoantigene, wie Hsp 70 und Disulfid-Isomerase ER-60, im Rattenserum nach EAO-Induktion identifiziert werden [23].

1.7 Experimentelle Autoimmunorchitis

Die experimentelle Autoimmunorchitis (EAO) der Ratte dient als Tiermodell zur Untersuchung der pathologischen Vorgänge bei testikulären Entzündungsreaktionen und immunologisch bedingter Infertilität. Es basiert auf der aktiven Immunisierung mit testikulären Autoantigenen und passendem Adjuvans. Die EAO ist eine durch T-Lymphozyten vermittelte Erkrankung und führt nach interstitieller Entzündung zu Tubulusatrophie und Keimzellverlust [88]. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung der EAO spielen $CD4^+$ -T-Lymphozyten, welche die Zytokine $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ und IL-2 sezernieren [86, 97]. Bei der Ratte wurde eine humorale Beteiligung an der EAO-Entwicklung durch den Nachweis von Autoantigenen mittels 2-D-Gel-Elektrophorese und Western-Blot gezeigt. Hierbei konnten verschiedene Autoantigene, bei welchen es sich unter anderem um Disulfid-Isomerase ER-60, Hitzeschockprotein 60 (Hsp60) und 70 (Hsp70) handelt, identifiziert werden [23].

1.8 Diagnostik testikulärer Entzündungen

Die Basisdiagnostik in der Fertilitätssprechstunde beinhaltet in den meisten Fällen eine Erhebung der Anamnese, die klinische Untersuchung, sowie gegebenenfalls die Hormon- und Urindiagnostik, sowie mindestens zwei Spermioogramme.

Die Entzündungsdiagnostik gehört ebenfalls zum Standard in der andrologischen Sprechstunde. Da chronische Entzündungen der Samenwege meist symptomlos für den Patienten verlaufen, gestaltet sich die Diagnosestellung schwierig. Neben einer erhöhten Anzahl von Entzündungszellen im Ejakulat werden zusätzliche Entzündungsmarker wie die Granulozytenelastase, IL-6 oder IL-8 und TNF- α im Ejakulat zur Diagnostik heran gezogen. Verschiedene Studien kommen zu dem Ergebnis, dass IL-6 und Granulozytenelastase geeignete zusätzliche Marker zur Diagnostik von Entzündungen des Genitaltraktes sind und eine Korrelation zwischen den Markern und den Spermienparametern besteht [39, 51]. Insbesondere die Bestimmung der Granulozytenelastase gilt als Ergänzung zur Ermittlung der Leukozytenkonzentration mittels Peroxidase-Reaktion im Nativpräparat, sowie sie auch zur Überwachung einer antientzündlichen Therapie eingesetzt wird.

Die Diagnostik der asymptomatischen testikulären Entzündungsreaktionen gestaltet sich in der Praxis als sehr schwierig. Ohne eine Hodenbiopsie, welche einen invasiven Eingriff darstellt, bleiben asymptomatische testikuläre Entzündungsreaktionen als Ursache oder Kofaktor für männliche Fertilitätsstörungen meist unerkannt. So gibt es bisher lediglich Therapierichtlinien für die akute Epididymitis, nicht jedoch für die chronischen Entzündungsprozesse im menschlichen Hoden. Bei Fertilitätspatienten mit asymptomatischen fokalen bis multifokalen Entzündungsreaktionen sind Tubuli mit zumindest noch teilweise erhaltener Spermatogenese vorhanden. Bei diesen Patienten kann nach Ausschluss systemischer oder lokaler Infektionen [92] eine immunsuppressive oder immunmodulatorische Therapie angedacht werden. Zum Einsatz sollten hierbei neben Glukokortikoiden auch nichtsteroidale Antiphlogistika kommen [31].

1.9 Zielsetzung der Arbeit: Testikuläre Autoantigene als mögliche diagnostische Marker der Hodenentzündung beim Mann

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines nicht-invasiven Verfahrens, zumindest im Sinne prädiktiver Marker, zur Erfassung asymptomatischer testikulärer Entzündungsreaktionen. Damit soll die Diagnostik einfacher und schneller gestaltet und der Patient möglichst früher einer Therapie zugeführt werden.

Es soll überprüft werden, ob das identifizierte testikuläre Autoantigen Protein-Disulfid-Isomerase ER-60 als diagnostischer Marker einer asymptomatischen testikulären Entzündung beim Mann dienen könnte. Basierend auf den Vorarbeiten der Forschungsgruppe „Reproduktionsbiologie“ von Prof. Dr. Meinhardt an der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Charakterisierung von Auto-Antigenen sowohl bei der tierexperimentellen Autoimmunorchitis als auch bei Patienten, bei denen durch eine Hodenbiopsie eine testikuläre Entzündung nachgewiesen wurde, soll mit der vorliegenden Arbeit ein ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Disulfid-Isomerase ER-60 etabliert werden, sowie überprüft werden, ob die gelieferten experimentellen Resultate bei einem breiten Patientenkollektiv aussagekräftig sind. Somit sollen die Grundlagen für eine verbesserte Diagnostik und Therapie geschaffen werden. Ziel der Untersuchungen ist die Differenzierung von gesunden Probanden und verschiedenen Patientenkollektiven mit Fertilitätsstörungen, um die Aussagekraft des Tests auf Immunantworten gegenüber testikulären Autoantigenen zu validieren.

2 Material und Methoden

2.1. Patienten

Insgesamt wurden 142 Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei den Teilnehmern handelt es sich ausschließlich um Männer zwischen 18 und 50 Jahren. Davon fungierten 21 Männer aus der andrologischen Sprechstunde als erste Kontrollgruppe (mit bekannten Spermiogrammbefunden) und weitere 21 Probanden als zweite Kontrollgruppe (Stichprobe männlicher Blutspender). 17 Patienten wiesen eine eingeschränkte Fertilität auf (Gruppe 3) und 32 Patienten erfüllten die Kriterien einer Samenwegsentzündung (Gruppe 4). Bei 14 Patienten wurde eine testikuläre Entzündung mittels Hodenbiopsie gesichert (Gruppe 5) und weitere 18 Patienten wurden mit entzündungshemmenden Medikamenten behandelt (Gruppe 6). Eine letzte Gruppe bestand aus 19 Patienten der urologischen Sprechstunde mit akuter Epididymo-Orchitis (Gruppe 7).

In der ersten Kontrollgruppe befanden sich insgesamt 21 Personen. Bei diesen Personen handelte es sich um Männer ohne andrologisch relevante Vorerkrankungen, die in zwei Untersuchungen reproduzierbar einen normalen Ejakulatbefund (Tab. 2, [10]) aufwiesen. Insbesondere sind, mit Hilfe der in der Routinediagnostik etablierten Methoden, Infektionen und /oder Entzündungsreaktionen im Bereich des Genitaltrakts ausgeschlossen worden [29, 77].

In Tabelle 2 sind die Referenzwerte eines normalen Spermiogrammbefundes aufgelistet.

Tabelle 2: Referenzwerte für ein Spermogramm nach WHO 2010 [10]

Parameter	Untere Referenzgrenze (WHO 2010)
Ejakulatvolumen (ml)	1,5 (1,4–1,7)
Gesamtmotilität (PR+NP%)	40 (38–42)
Progressive Motilität (PR%)	32 (31–34)
Vitalität (%)	58 (55–63)
Gesamte Spermienzahl (10 ⁶ / Ejakulat)	39 (33–46)
Spermienkonzentration (10 ⁶ /ml)	15 (12–16)
Spermienmorphologie (Normalformen %)	4 (3–4)
Weitere vereinbarte Normwerte	
pH	≥ 7,2
Zink (µmol/Ejakulat)	≥ 2,4
Fruktose (µmol/Ejakulat)	≥ 13
Neutrale α-Glukosidase (mU/Ejakulat)	≥ 20
Peroxidase positive Leukozyten (10 ⁶ /ml)	< 1
MAR-Test (%)	< 50
Immunobead-Test (%)	< 50

In der zweiten Kontrollgruppe waren insgesamt 21 Probanden eingeschlossen. In dieser Gruppe handelte es sich um Stichproben männlicher Blutspender, um die Autoantikörperprävalenz gegen ER-60 in der allgemeinen männlichen Bevölkerung zu bestimmen.

Eine dritte Gruppe umfasste 17 Patienten und schloß Männer mit eingeschränkter Fertilität ein, bei denen zum Untersuchungszeitpunkt keine Anhaltspunkte für Infektionen oder Entzündungen vorlagen. Einschlusskriterium war eine Spermienkonzentration unter 15 Millionen/ml.

In der 4. Gruppe waren 32 Patienten, die auf der Basis einer Ejakulatuntersuchung die Kriterien einer Samenwegsentzündung oder einer Samenwegsinfektion erfüllten (s. Tab. 2). Die Zuteilung zu der Gruppe mit Samenwegsentzündung/-infektion erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Peroxidase positive Leukozyten $> 1 \times 10^6/\text{ml}$
- Granulozytenelastase $> 250 \text{ ng/ml}$ und /oder
- IL-6 (pg/ml) $> 30 \text{ pg/ml}$

Ein weiterer Bestandteil der Gruppe 4 sind Patienten, die in der mikrobiologischen Untersuchung des Ejakulats pathologische Befunde im Sinne einer Samenwegsinfektion aufwiesen (Ureaplasmen, Mykoplasmen, Neisserien, Enterobacter).

In der 5. Gruppe waren 14 Patienten mit histologisch gesicherter testikulärer Entzündung. Der Ejakulatbefund der Patienten aus Gruppe 5 zeigte eine Azoospermie, welche primär testikulär und nicht durch obstruktive Verschlüsse bedingt war. Es wurden (multi-)fokale Biopsien beidseits zu diagnostischen, sowie therapeutischen Zwecken entnommen und in der histologischen Aufarbeitung und immun-histochemischen Färbung zeigte sich eine testikuläre Entzündung [81].

Die 6. Gruppe bestand aus 18 Patienten. Bei diesen Probanden handelte es sich um Patienten, deren erkannte testikuläre Entzündung bzw. Samenwegsentzündung im Rahmen einer klinisch-andrologischen Betreuung mit entzündungshemmenden Medikamenten (z. B. Diclofenac) behandelt wurde.

In einer 7. Gruppe wurden 19 Patienten aus der urologischen Sprechstunde mit akuter Epididymo-Orchitis einbezogen.

Das Studienprotokoll und die zugehörigen Dokumente wurden von der Ethik-Kommission am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen geprüft und genehmigt (AZ:170/07).

Alle beteiligten Patienten gaben nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung in die Teilnahme an dieser Studie. Die Proben und Datensätze wurden anonymisiert und allesamt vertraulich und entsprechend den Datenschutzvorschriften behandelt.

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Blotting Grade Blocker (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad, München
DTT	Roche, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
H ₂ SO ₄ , 2N	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, München
IPTG	Roth, Karlsruhe
KCL	Merck, Darmstadt
KOH	Merck, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
PBS (Dulbecco´s PBS 1x)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
PMSF	Sigma, München
Streptavidin-HRP-Konjugat	Amersham Biosciences, Großbritannien
TMB (BD OptEIA™ - Substrate Reagent Set)	BD Biosciences, Heidelberg
Tween®20 (Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat)	Roth, Karlsruhe

2.2.2 Antigene, Antikörper und Enzyme

Antigen	
Rekombinantes ER-60	Bereitstellung s. Kapitel 2.3.2

Tabelle 3: Antikörper und Enzyme

Antikörper/ Enzyme	Firma	Konzentration (mg/ml)	Verdünnung
Monoklonaler Antikörper, Mouse Anti-Endoplasmic Reticulum Protein 57 (ERp57)	Stressgen Bioreagents, USA	1,0	(s. Tab. 4)
Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific	Dianova, Hamburg	1,0	1:50.000 in Blocklösung
Anti- mouse IgG biotinylated (whole antibody from goat)	GE Healthcare, Großbritannien	1,0	1:4000 in Blocklösung
Streptavidin- Horseradish Peroxidase Conjugate	Amersham Biosciences, Großbritannien		1:4000 in Waschpuffer

2.2.3 Puffer und Lösungen

Blocklösung:

2% Magermilchpulver in PBS

Carbonatpuffer (0,1M):

Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	8,40 g/l
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	3,56 g/l

(Die Reagenzien wurden in einem Liter Aqua dest. gelöst und auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt.)

PBS :

wurde gebrauchsfertig von PAA Laboratories GmbH bezogen

Stopplösung:

Schwefelsäure (2N H₂SO₄)

Waschpuffer

0,05 % Tween 20 in PBS

2.2.4 Verdünnungsreihen

Für die Serenverdünnungsreihe und Standardverdünnungsreihe sind unter Tabelle 4 und 5 die jeweiligen Pipettierschemata abgebildet.

Tabelle 4: Pipettierschema der Serenverdünnungsreihe

Probengefäß	Faktor	Serum (µl)	Blocklösung (µl)
1	unverdünnt	200	0
2	1 : 2	125	125
3	1 : 5	50	200
4	1 : 10	25	225
5	1 : 50	5	245
6	1 : 100	2,5	247,5
7	1 : 500	0,5	249,5
8	1 : 1000	0,25	249,75

Tabelle 5: Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe

Probengefäß	Faktor	Mouse Anti-ER-60 Konzentration (ng/ml)
1	1 : 10.000	100
2	1 : 20.000	50
3	1 : 40.000	25
4	1 : 80.000	12,5
5	1 : 160.000	6,25
6	1 : 320.000	3,125
7	1 : 640.000	1,5625
8	Leerwert (nur Blocklösung)	0

2.2.5 Spezielle Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Research plus Pipetten	Eppendorf, Hamburg
8-Kanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Tubes (2 ml, 10ml, 20ml)	Eppendorf, Hamburg
96 Well Immuno Module Platten MediSorp	Nunc, Wiesbaden

2.2.6 Geräte

M52 Minishaker (Vortexer)	IKA Works Inc, USA
VersaMax ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, USA
Kühlschrank	Liebherr, Schweiz
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
VersaMax ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, USA
Anionenaustauschersäule Mono Q HR	GE Healthcare, Freiburg
Größenaustauschersäule Superdex 200 HR	GE Healthcare, Freiburg

2.2.7 Software

GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software Inc., USA
Microsoft Excel 2003	Microsoft Corporation, USA
SoftMax Pro	Molecular Devices, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung der Serumproben

Um intra- und interindividuell vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten wurden folgende Kriterien bei der Probenentnahme bzw. Probenverarbeitung eingehalten:

- Verwendung eines Blutentnahmesystems (Serum-Monovetten)
- einheitliche Zentrifugationsbedingungen (10 Minuten bei 4000 rpm)
- Abtrennen des Überstandes (Serum) und Einfrieren der Proben bei -20°C in Aliquots à 500 μl
- Vermeidung des erneuten Einfrierens und Wiederverwendens bereits aufgetauter Proben

2.3.2 Bereitstellung von ER-60

Rekombinantes, in *E.coli* exprimiertes Protein Disulfid Isomerase ER-60 (Synonyme: ERp57, p58) wurde bereitgestellt. Dies erfolgte aus einem Expressionsklon pET21a, der die DNA-Sequenz von humanem ER-60 trägt (pET-hER-60-Expressionsklon) wie beschrieben in Urade et al. [89]. Das Protein wird exprimiert, in *E.coli* BL21 (DE3), nach dem Protokoll von Urade et al. [89] und aufgereinigt mittels HPLC.

Dazu wurde das Expressionsplasmid pET21-hER60 in *E.coli* BL21 (DE3) transformiert und unter geeigneten Bedingungen kultiviert (in Anwesenheit von Ampicillin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 400ml LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl; pH 7.0) bei 30°C). Die Proteinexpression wurde mit 0,5mM iso-propyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid (IPTG) bei 30°C über 2h induziert. Anschließend wurde die bakterielle Kultur geerntet und das Pellet unter geeigneten Bedingungen aufgenommen und präzipitiert, in 10ml Puffer A (20mM HEPES- KOH [pH 6.8], 50mM KCL, 5mM EDTA [pH 8.0], 1mM PMSF) resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Das Zellysate wurde 30 min bei 4°C bei 5000 x g abzentrifugiert und der Überstand mit 70% saturiertem Ammoniumsulfat 30 min bei 4°C präzipitiert. Das Proteinpellet wurde dann in 500 μl modifiziertem Puffer A (20mM HEPES- KOH [pH 6.8], 50mM KCl, 5mM EDTA [pH 8.0], 1mM DTT) resuspendiert und mittels Gelfiltration (Superdex 200 HR) in der HPLC gereinigt. In einem alternativen Schritt wurden die Fraktionen, die hER-60 beinhalten, zusätzlich auf einer Mono Q Säule in 10ml modifiziertem Puffer A aufgereinigt. Proteine, welche an die Säulenmatrix gebunden hatten, wurden in Puffer B

(20mM HEPES-KOH [pH 6.8], 1M KCL, 5mM EDTA [pH 8.0], 1mM DTT) eluiert. Die Proteinreinheit wurde in einem SDS-PAGE-Gel und mit Western- Blot mit monoklonalem Maus anti-Erp57/ER-60-Antikörper (s. Tab. 3) überprüft.

2.3.3 Testprinzip ELISA (Enzyme- linked Immunosorbent Assay)

1967 gelang es Nakane und Pierce erstmals Enzyme zur Markierung in der Immunhistochemie zu verwenden [65]. Nur wenige Jahre später entwickelten Engvall und Perlmann ein Verfahren, welches eine enzymatische Markierung von Antikörpern mit deren Immobilisation auf Oberflächen kombinierte. So etablierten sie den ersten ELISA [22]. Durch die einfache Durchführbarkeit mit hoher Selektivität und Sensitivität entwickelte sich der ELISA sehr schnell zu einem Standardverfahren.

Ein ELISA ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Mit diesem Testverfahren kann in kurzer Zeit eine hohe Anzahl von Proben untersucht werden und so wird dieses Verfahren im klinischen Alltag häufig als Screeningverfahren (z.B. für HIV) eingesetzt [99].

Es handelt sich um einen Festphasen-Enzymimmunoassay. Hierbei wird ein Markermolekül (Enzym) an Antigen oder Antikörper gebunden. Durch Zugabe des entsprechenden Substrats wird die Antigen-Antikörper-Reaktion durch einen Farbumschlag sichtbar gemacht. Dieses Signal kann über eine photometrische Messung detektiert und quantifiziert werden. Es gibt unterschiedliche ELISA-Techniken, wobei man kompetitive und nichtkompetitive sowie direkte und indirekte Assays unterscheiden kann.

2.3.3.1 Direkte und indirekte Assays

Bei einem direkten Assay ist der spezifische Antikörper bereits direkt mit einem Enzym markiert und bindet an das Antigen (s. Abb 3A). Es sind weniger Inkubationsschritte nötig und das Auftreten von unspezifischen Bindungen kann herabgesetzt werden. Im Gegensatz dazu ist bei einem indirekten Assay ein enzymmarkierter zweiter Antikörper (Anti-Antikörper) notwendig, welcher gegen den spezifischen Antikörper gerichtet ist (s. Abb. 3B). Ein Vorteil des indirekten Assays ist, dass pro gebundenem Primärantikörper mehrere enzymmarkierte Sekundärantikörper binden können und es so zu einer Signalverstärkung kommt.

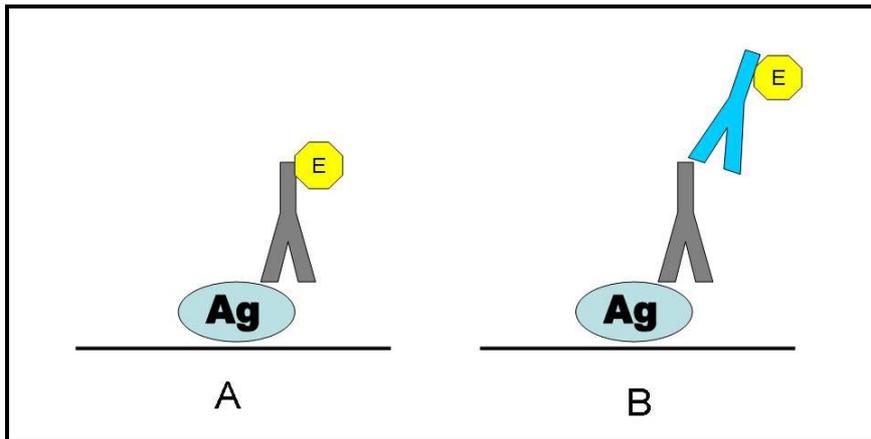


Abbildung 3. ELISA: Direkter (A) und indirekter (B) Nachweis von Antigenen (Ag)
A) Der Primärantikörper, der an das Antigen bindet, ist direkt mit Enzym (E) markiert
B) Der enzymmarkierte Sekundärantikörper bindet an den konstanten Teil des Primärantikörpers

2.3.3.2 Kompetitive und nichtkompetitive Assays

Eine weitere Unterscheidung kann zwischen kompetitiven und nichtkompetitiven ELISA getroffen werden. Bei einem kompetitiven Assay tritt der Analyt (Antigen oder Antikörper) aus der zu messenden Probe in Konkurrenz zu dem Antigen, welches in bekannter Konzentration zugegeben wurde. Dabei kann entweder das Antigen oder der Antikörper an die ELISA-Platte gebunden sein (s. Abb. 4). Hierbei ist das gemessene Signal direkt proportional zur Menge an gebundenem Enzym und umgekehrt proportional zur Menge an Antigen aus der Probe.

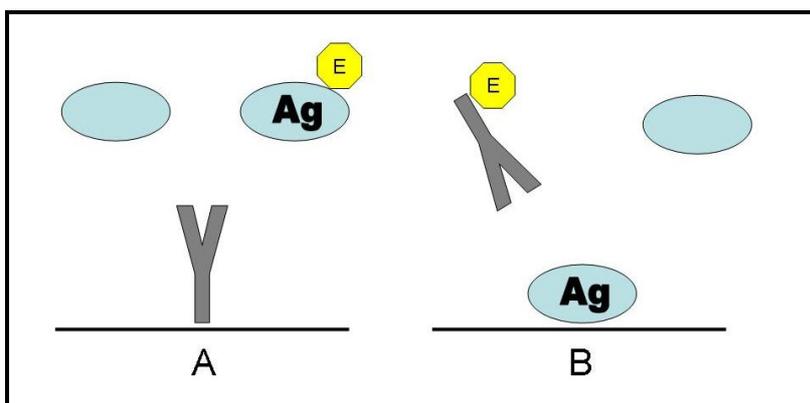


Abbildung 4. ELISA: Kompetitive Assays
A) Enzymmarkiertes Antigen und Analyt konkurrieren um die Bindung an den spezifischen Antikörper
B) Das gebundene Antigen konkurriert mit dem Analyt um den enzymmarkierten spezifischen Antikörper

Bei den nichtkompetitiven Assays unterscheidet man zwischen dem antibody capture assay und dem Sandwich-Immuno Assay (Doppel Antikörper-Methode). Eine häufig verwendete ELISA-Technik ist der Sandwich-ELISA. Dabei werden Mikrotiterplatten mit einem gegen das gesuchte Antigen gerichteten Antikörper (Fängerantikörper) beschichtet. Nach Zugabe des Antigens (aus der Probe) und eines zweiten, enzymgekoppelten Antikörpers (Detektionsantikörper), welcher an das Antigen bindet, wird ein geeignetes Substrat, welches durch das gekoppelte Enzym umgesetzt wird, zugegeben. Es kommt anschließend zu einem Farbumschlag. Die Intensität der Farbreaktion ist dabei proportional zur Menge des gebundenen Enzyms und somit auch zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens in den Proben (s. Abb. 5).

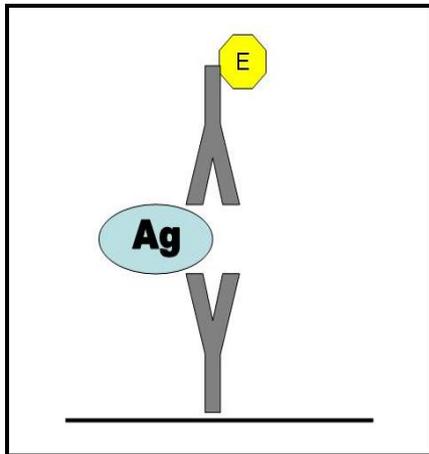
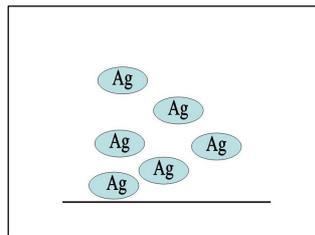


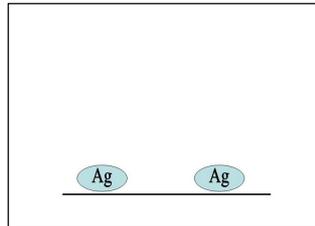
Abbildung 5. Prinzip eines Sandwich- ELISA: Das Antigen befindet sich zwischen zwei spezifischen Antikörpern

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen ELISA zum Nachweis und zur Quantifizierung von ER-60-spezifischen Antikörpern im Serum zu etablieren. Als geeignetes Testverfahren haben wir uns für den nichtkompetitiven Assay entschieden. Bei den nichtkompetitiven Verfahren muss das Antigen zuerst hergestellt und dann an die Testplatte gebunden werden; dies ist eine experimentell aufwendigere Methode. Des Weiteren gehört der von uns entwickelte ELISA zu den indirekten Assays. Die Vorteile dieser Methode sind unter anderem die oben beschriebene Signalverstärkung. Bei dieser Variante wird zuerst das Antigen an eine feste Phase (ELISA-Platte) gekoppelt und anschließend die Probe aufgetragen, in der die zu bestimmenden Antikörper enthalten sind. Nach Inkubation folgt ein Waschschriff, und ein enzymmarkierter

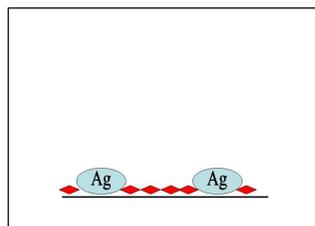
Sekundärantikörper wird hinzugegeben, der an dem konstanten Teil der gebundenen Erstantikörper bindet (s. Abb. 6). Es folgt ein erneuter Waschschrift und das Enzymsubstrat, welches für die Quantifizierung notwendig ist, wird zugegeben. Es kommt zu einem Farbumschlag, welcher anschließend photometrisch gemessen wird.



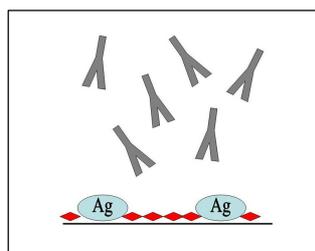
1. Beschichtung der ELISA-Platte mit Antigen (Ag)



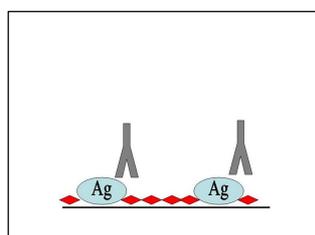
2. Antigen bindet an ELISA-Platte und nicht gebundenes Antigen wird in einem ersten Waschschrift entfernt



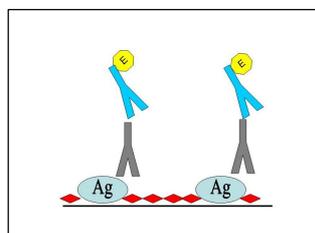
3. Blockierlösung wird hinzugegeben und ein weiterer Waschschrift folgt



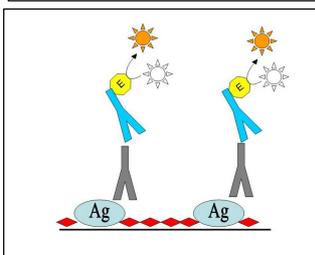
4. Die Probe (Serum), mit den zu detektierenden Antikörpern wird zugegeben



5. Die Antikörper und haben an das Antigen gebunden und überschüssige Antikörper werden durch einen erneuten Waschschrift entfernt



6. Es folgt die Zugabe des enzymmarkierten Antikörpers und anschließend ein weiterer Waschschrift



7. Das geeignete Substrat wird zugefügt und ein Farbumschlag wird sichtbar

Abbildung 6. Prinzip und Versuchsablauf eines nichtkompetitiven ELISA

2.3.4 Etablierung eines ELISA

Das Testprinzip des ELISA stellt ein schnell durchführbares, spezifisches und sehr sensitives diagnostisches Verfahren dar.

Der erste Schritt war die Beschichtung der 96-Well-Mikrotiterplatte (MediSorp) mit dem Antigen (rekombinantes ER-60). Das Antigen wurde zuvor in einer Konzentration von 2,5µg/ml in einem Carbonatpuffer (pH 9.5) gelöst. In Vorversuchen wurden verschiedene Beschichtungskonzentrationen des Antigens ausgetestet und eine Beschichtungskonzentration von 2,5µg/ml rekombinanten ER-60 in Carbonatpuffer selektiert (s. Kapitel 3.2.1, Abb. 11). Jeweils 100µl der Antigenlösung wurden in die einzelnen Vertiefungen der ELISA-Platte gegeben und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am zweiten Tag des Versuchsablaufs wurde der Inhalt der Wells abgeschüttet und der Rest der Flüssigkeit durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Es folgte ein erster Waschschrift, welcher dreimaliges Spülen der Wells mit jeweils 250µl Waschpuffer und anschließendes kräftiges Ausklopfen der ELISA-Platte beinhaltete. Nach der Beschichtung der ELISA-Platte mit dem Antigen-Carbonatpuffer-Gemisch, kann es noch Bereiche auf der Platte geben, die weiteres Protein binden könnten. Um die spätere unspezifische Bindung von Proteinen an diese freien Stellen und damit eine Erhöhung des Hintergrundsignals zu verhindern, wurde die ELISA-Platte mit einer Blocklösung (Zusammensetzung s. Kap. 2.2.3) behandelt. Dazu wurden 200µl Blocklösung in jedes Well gegeben und für zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte erneut ausgeklopft und es folgte die Zugabe der Serenverdünnungsreihe bzw. der Standardverdünnungsreihe (s. Tabelle 4 bzw. 5) in Blocklösung mit 100µl/ Well für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Proben wurden unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungen (s. Tabelle 4) auf die ELISA-Platte aufgetragen. Abbildung 7 zeigt die Plattenbelegung einer 96-Well-ELISA-Platte mit Serumproben, Standard und Leerwerten. Zur Herstellung der Standardverdünnungsreihe wurden zuerst in einem Eppendorf-Gefäß 500µl Standard (Konzentration: 1mg/ml) in Blocklösung in einer Verdünnung von 1:10.000 hergestellt und auf dem Vortexer gut durchgemischt. Dann wurden 250µl dieses Gemischs abpipettiert und in das nächste Eppendorf- Gefäß, in welchem schon 250µl Blocklösung vorgelegt waren, umpipettiert. Auch dieser Ansatz wurde gut durchgemischt und der beschriebene Vorgang wurde bis zu einer Konzentration des Standards von 1,5625ng/ml bzw. bis zu einer Verdünnung von 1:640.000 wiederholt (s. Abb. 8). Dabei wurde jede

Probe und auch der Standard doppelt auf die ELISA-Platte aufgetragen. Im nächsten Arbeitsschritt wurde der schon beschriebene Waschvorgang ein zweites Mal wiederholt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in Blocklösung. Hierbei wurde für die Serumproben Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Human IgG und für die Standardreihe Goat Anti-Mouse IgG verwendet (Verdünnung s. Kap. 2.2.4) und mit jeweils 100µl/ Well für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein dritter Waschschritt mit erneutem dreimaligem Waschen und Ausklopfen der ELISA- Platte. Danach wurde die Platte mit Streptavidin-HRP-Konjugat (s. Kap. 2.2.4) im Waschpuffer (je 100µl/Well) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein fünfmaliges Waschen und Trockenschlagen der ELISA-Platte. Daraufhin wurde Tetramethylbenzidin (TMB), je 100µl/Well, welches schon 15 Minuten vorher angesetzt wurde, hinzugegeben. Die Inkubation mit TMB erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit. Hiernach folgte die Zugabe von 50µl Stopplösung (Schwefelsäure), welche die Färbereaktion stoppte.

Die Messung der Extinktion in den einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte erfolgte mit dem VersaMax ELISA Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 450nm und 570nm. Die zusätzliche Messung mit 570nm als Referenzwellenlänge gleicht die optische Ungenauigkeit der Platte aus. Die Intensität der Farbreaktion bzw. die Extinktion ist hierbei proportional zur Konzentration des zu analysierenden Proteins.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Probe 1 (unver- dünn)	Probe 1 (unver- dünn)	Probe 2 (unver- dünn)	Probe 2 (unver- dünn)	Probe 3 (unver- dünn)	Probe 3 (unver- dünn)	Probe 4 (unver- dünn)	Probe 4 (unver- dünn)	Probe 5 (unver- dünn)	Probe 5 (unver- dünn)	Standard 1:10.000	Standard 1:10.000
B	Probe 1 1:2	Probe 1 1:2	Probe 2 1:2	Probe 2 1:2	Probe 3 1:2	Probe 3 1:2	Probe 4 1:2	Probe 4 1:2	Probe 5 1:2	Probe 5 1:2	Standard 1:20.000	Standard 1:20.000
C	Probe 1 1:5	Probe 1 1:5	Probe 2 1:5	Probe 2 1:5	Probe 3 1:5	Probe 3 1:5	Probe 4 1:5	Probe 4 1:5	Probe 5 1:5	Probe 5 1:5	Standard 1:40.000	Standard 1:40.000
D	Probe 1 1:10	Probe 1 1:10	Probe 2 1:10	Probe 2 1:10	Probe 3 1:10	Probe 3 1:10	Probe 4 1:10	Probe 4 1:10	Probe 5 1:10	Probe 5 1:10	Standard 1:80.000	Standard 1:80.000
E	Probe 1 1:50	Probe 1 1:50	Probe 2 1:50	Probe 2 1:50	Probe 3 1:50	Probe 3 1:50	Probe 4 1:50	Probe 4 1:50	Probe 5 1:50	Probe 5 1:50	Standard 1:160.000	Standard 1:160.000
F	Probe 1 1:100	Probe 1 1:100	Probe 2 1:100	Probe 2 1:100	Probe 3 1:100	Probe 3 1:100	Probe 4 1:100	Probe 4 1:100	Probe 5 1:100	Probe 5 1:100	Standard 1:320.000	Standard 1:320.000
G	Probe 1 1:500	Probe 1 1:500	Probe 2 1:500	Probe 2 1:500	Probe 3 1:500	Probe 3 1:500	Probe 4 1:500	Probe 4 1:500	Probe 5 1:500	Probe 5 1:500	Standard 1:640.000	Standard 1:640.000
H	Probe 1 1:1000	Probe 1 1:1000	Probe 2 1:1000	Probe 2 1:1000	Probe 3 1:1000	Probe 3 1:1000	Probe 4 1:1000	Probe 4 1:1000	Probe 5 1:1000	Probe 5 1:1000	Leerwert	Leerwert

Abbildung 7. Plattenbelegung der 96-Well-ELISA-Platte. Auf einer Platte finden sich Standardreihe, Proben und Leerwert.

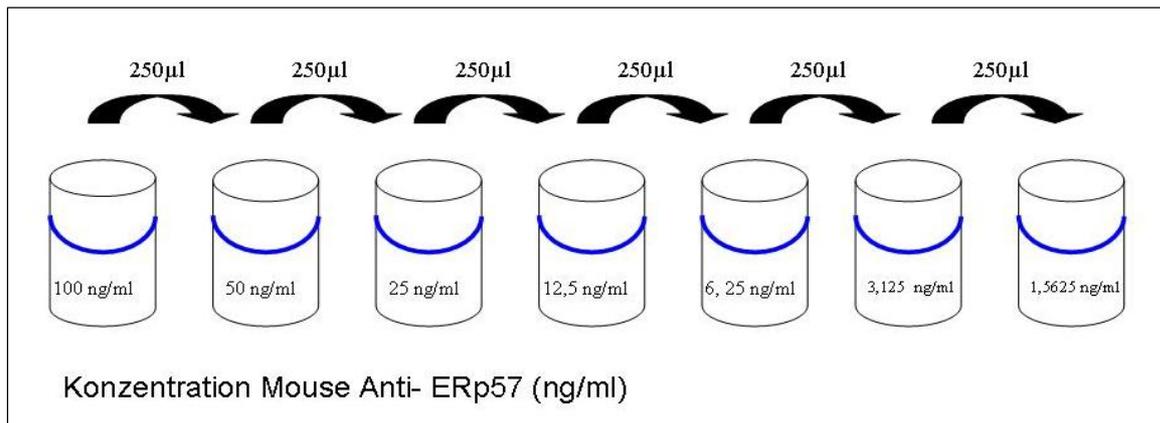


Abbildung 8. Schema Herstellung Standardverdünnungsreihe

2.3.4.1 Protokoll des etablierten ER-60-ELISA

1. Tag

- I. Beschichtung der ELISA-Platte mit Antigen (rekombinantes ER-60) in einer Konzentration von $2,5\mu\text{g/ml}$ in Carbonatpuffer mit jeweils $100\mu\text{l/Well}$, bei $+4^\circ\text{C}$ im Kühlschrank, über Nacht

2. Tag

- I. Erster Waschschrift
- II. Inkubation mit Blocklösung für 2,5 h bei RT
- III. Inkubation mit Seren bzw. Standard in Blocklösung für 1h bei RT
- IV. Zweiter Waschschrift
- V. Inkubation mit zweitem Antikörper in Blocklösung für 1h bei RT
- VI. Dritter Waschschrift
- VII. Inkubation mit Streptavidin-HRP-Konjugat im Waschpuffer für 20 min bei RT
- VIII. Vierter Waschschrift
- IX. Inkubation mit TMB (Substrat) für 20 min bei RT, in Dunkelheit
- X. Zugabe der Stopplösung
- XI. Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450nm und 570nm im ELISA-Reader

2.3.4.2 Standardkurve und Berechnung der Testergebnisse

Die Auswertung der Platte konnte mit dem Programm Microsoft Excel (2003) erstellt werden.

Bei jeder ELISA-Platte wurde eine Standardverdünnungsreihe gemäß den bereits oben aufgeführten Angaben inkubiert. Die Umrechnungen der Extinktionen in die Absolutwerte (Konzentration) erfolgte anhand der Standardkurven der jeweiligen ELISA-Platte.

Nachdem alle 96 Wells einer Platte bei 450nm und 570nm (Referenzwellenlänge) gemessen wurden, konnten aus den Doppelbestimmungen die Mittelwerte errechnet werden. Die gebildeten Mittelwerte der Messungen mit der Referenzwellenlänge wurden von den Mittelwerten der Messungen bei 450 nm subtrahiert. So erhielt man die korrigierten Absorptionswerte (Mittelwerte nach Wellenlängenkorrektur) von Leerwert, Standards und Proben.

Die ermittelten und logarithmierten Absorptionen der Standards (y) wurden gegen den Logarithmus (\log_{10}) der Standard- Konzentrationen in ng/ml aufgetragen (x-Achse). Aus diesen Werten wurde daraufhin eine Regressionsgerade ($y = m x + b$) berechnet. Unter Verwendung dieser Regressionsgeraden der Standardkurve (s. Abb. 9) konnte anschließend die Antikörperkonzentration (ng/ml) für jede getestete Serumprobe anhand des OD-Wertes der jeweiligen Probe errechnet werden. In der Abbildung 2.7 betrug die Regressionsgerade: $y = 5,995x - 0,9769$. Die Streuung der Standardkurve (lineare Regression) ergab $R^2 = 0,993$.

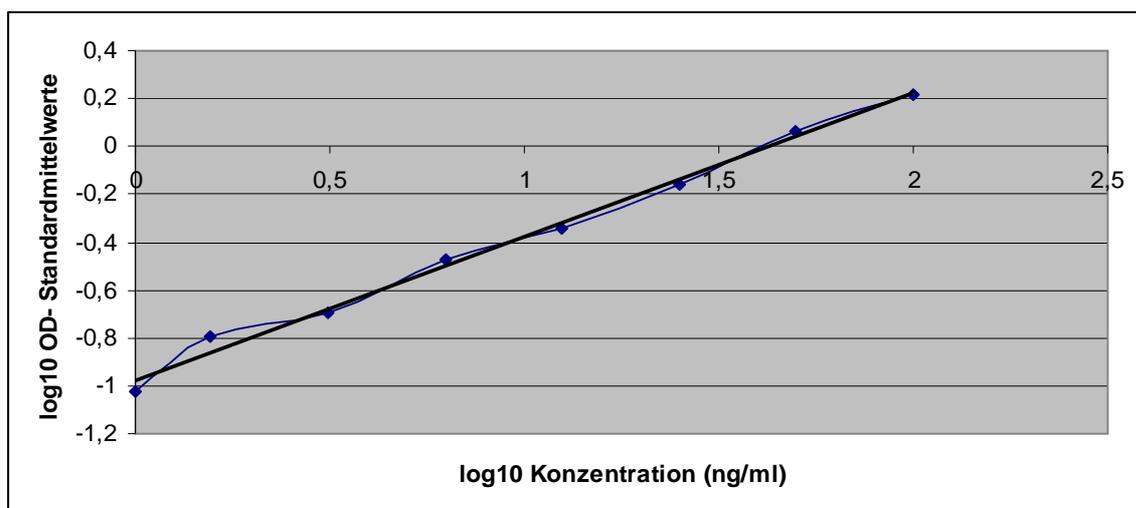


Abbildung 9. Beispiel einer Standardkurve mit Regressionsgeraden zur Ermittlung der Konzentrationen aus gemessenen OD-Werten des ER-60-ELISA

2.3.5 Statistik

Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Messwerte erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism® 4.0 und Microsoft Excel® 2003. Zu Beginn der statistischen Analyse wurden alle Mittelwerte der einzelnen Patientengruppen berechnet. Als erster statistischer Test wurde als one-way ANOVA (Analysis of variance) der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dies ist ein nicht-parametrischer statistischer Test zum Vergleich der Mittelwerte von ≥ 2 unabhängigen Stichproben (Gruppen). Er sollte überprüfen, ob die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sich signifikant unterscheiden. Er wurde gewählt, da die Werte in den Gruppen nicht alle normalverteilt waren. Anschließend wurde als Post-Test der Dunn's Multiple Comparison Test durchgeführt. Dieser Test dient dem Gruppenvergleich und vergleicht die Rangsummen von zwei Gruppen.

Die Signifikanzniveaus wurden folgendermaßen festgelegt:

$p > 0,05 =$	n.s.
$p \leq 0,05 =$	*
$p \leq 0,01 =$	**
$p \leq 0,001 =$	***

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten von insgesamt 142 Patienten ausgewertet. Die gesammelten und ausgewerteten Serumproben stammten hierbei aus unterschiedlichen Kliniken bzw. Instituten des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen (Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie und Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie) und des Universitätsklinikums der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Sektion Andrologie). Die experimentellen Untersuchungen wurden in dem Labor der Forschungsgruppe „Reproduktionsbiologie“ (Leiter Prof. Dr. Meinhardt) am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

3.1 Patienten- und Gruppendaten

3.1.1 Klinische Daten der untersuchten Probanden- und Patientengruppen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sieben verschiedene Patientengruppen gebildet und deren Seren untersucht. In Tabelle 6 findet sich die Zuordnung der jeweiligen Gruppennummer.

Tabelle 6: Übersicht über die Probanden- und Patientengruppen

Gruppe	Bedeutung
1	Kontrollgruppe (Normozoosperme Männer aus andrologischer Sprechstunde)
2	Kontrollgruppe (Blutspender mit unbekanntem Fertilitätsstatus)
3	Patienten mit eingeschränkter Fertilität
4	Patienten mit Samenwegsentzündung/ Samenwegsinfektion
5	Patienten mit testikulärer Entzündung (Hodenbiopsie)
6	Patienten nach antientzündlicher Therapie
7	Patienten mit akuter, symptomatischer Epididymo-Orchitis

Die Probanden aus Gruppe 1 stellten eine Kontrollgruppe dar. Es handelt sich um Patienten, die sich in der andrologischen bzw. Infertilitäts-Sprechstunde von Prof. Dr. Schuppe (Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie,

Universitätsklinikum Gießen) vorstellten. In diese Gruppe wurden nur Männer ohne andrologisch relevante Vorerkrankungen eingeschlossen, die in zwei Untersuchungen reproduzierbar einen normalen Ejakulatbefund (s. Tab. 2) aufwiesen. Insbesondere sind, mit Hilfe der in der Routinediagnostik etablierten Methoden, Infektionen und /oder Entzündungsreaktionen im Bereich des Genitaltrakts ausgeschlossen worden.

Die Gruppe 2 stellt ebenfalls eine Kontrollgruppe dar, jedoch handelt es sich nicht um Patienten, sondern um freiwillige männliche Blutspender (aus dem Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universitätsklinik Gießen). Aus dieser Gruppe war lediglich das Geburtsdatum bekannt. Es sollte hier durch Stichproben von Blutspendern die Prävalenz ER-60-spezifischer Autoantikörper in der allgemeinen männlichen Bevölkerung bestimmt werden.

In Gruppe 3 wurden Männer mit eingeschränkter Fertilität eingeschlossen. Ein Einschlusskriterium war eine Spermienkonzentration unter 15 Millionen/ml und es durften zum Untersuchungszeitpunkt mit der in der Routinediagnostik etablierten Methodik keine Anhaltspunkte für Infektionen oder Entzündungen vorliegen. In dieser Gruppe finden sich Patienten aus der andrologischen bzw. Infertilitäts-Sprechstunde von Prof. Dr. Schuppe.

Die Patienten der Gruppe 4 stammten aus der andrologischen Sprechstunde in Gießen und der Klinik für Dermatologie, Sektion Andrologie (Universitätsklinikum Bonn) und erfüllten die Kriterien einer Samenwegsentzündung und/oder einer Samenwegsinfektion (Kriterien s. Kap. 2.1), welche durch eine Ejakulatuntersuchung festgestellt wurde.

Gruppe 5 umfasste Patienten mit Azoospermie, bei denen aufgrund einer durchgeführten Hodenbiopsie, die Diagnose einer testikulären Entzündung gestellt wurde. Die Patienten gehörten, wie in Gruppe 4, zu dem Patientengut der Klinik für Urologie und Andrologie (Universitätsklinikum Gießen) und der Klinik für Dermatologie, Sektion Andrologie (Universitätsklinikum Bonn).

Gruppe 6 bestand aus Patienten der andrologischen Sprechstunde der Klinik für Dermatologie, Sektion Andrologie (Universitätsklinikum Bonn). Die eingeschlossenen Männer hatten eine diagnostizierte testikuläre Entzündung bzw. Samenwegsentzündung

und wurden im Rahmen ihrer klinisch-andrologischen Betreuung mit entzündungshemmenden Medikamenten (Nichtsteroidale-Antiphlogistika) behandelt.

In Gruppe 7 sind Patienten aus der Akutsprechstunde der Klinik für Urologie und Andrologie (Universitätsklinikum Gießen) aufgenommen, welche an einer akuten und symptomatischen Epididymo-Orchitis erkrankt waren.

3.1.2 Anzahl und Alter in den Patientengruppen

Insgesamt wurden die Serumproben von 142 Probanden und Patienten untersucht. Dabei befanden sich 21 Männer in Gruppe 1 (Kontrollgruppe mit bekannten Spermiogrammbefunden) und weitere 21 Probanden als Kontrollgruppe 2 (Stichprobe männlicher Blutspender mit unbekanntem Fertilitätsstatus). 17 Patienten wiesen eine eingeschränkte Fertilität (Gruppe 3) auf und 32 Patienten erfüllten die Kriterien einer Samenwegsentzündung/infektion (Gruppe 4). Weitere 14 Patienten wiesen eine testikuläre Entzündung auf, welche mittels Hodenbiopsie gesichert war (Gruppe 5) und 18 Patienten wurden bei einer Samenwegsentzündung mit entzündungshemmenden Medikamenten (Gruppe 6) behandelt. Eine siebte Gruppe bestand aus 19 Patienten aus der urologischen Sprechstunde mit akuter Epididymo- Orchitis (Gruppe 7).

Es wurden nur Serumproben von männlichen Patienten in die Messungen einbezogen. Das Patientenalter lag in den Gruppen 1-6 zwischen 18 und 50 Jahren (s. Tabelle 7). Die Patienten aus Gruppe 7 überschritten teilweise die Altersgrenze von 50 Jahren, abweichend vom initialem Studienprotokoll. Das Alter der Studienpopulation lag im Mittelwert bei 38,4 Jahren.

Tabelle 7: Anzahl und Alter der Patienten in den unterschiedlichen Gruppen

	Anzahl Patienten (n)	Alter (Jahre) Mittelwert	Minimum- Maximum
Gruppe 1	21	34,5	25-47
Gruppe 2	21	33,1	18-50
Gruppe 3	17	35,7	22-48
Gruppe 4	32	37,4	25-50
Gruppe 5	14	35	29-43
Gruppe 6	18	39,4	30-50
Gruppe 7	19	51,8	18-83
Gruppe 1-6	123	37,5	18-50
Gesamt	142	38,4	18-83

3.1.3 Patientencharakteristika

In den verschiedenen Gruppen von Patienten, welche die Infertilitätssprechstunde besuchten, wurde auch das Alter der Partnerin und die Dauer des Kinderwunsches des Paares untersucht. Tabelle 8 gibt eine Übersicht darüber. Es finden sich zwar Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen, jedoch ist dieser statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tabelle 8: Dauer des Kinderwunsches und Alter der Partnerin der Patienten in der Infertilitätssprechstunde in den verschiedenen Gruppen

	Dauer Kinderwunsch (Jahre) Mittelwert	Minimum- Maximum	Alter der Partnerin (Jahre) Mittelwert	Minimum- Maximum
Kontrollgruppe 1	2,1	0,5-7	31,4	21-40
Gruppe 3	2,2	0,5-10	33,9	26-41
Gruppe 4	2,7	0,5-8	34,3	23-41
Gruppe 5	1,5	1-6	29,0	26-36
Gruppe 6	2,4	0,5-8	33,3	25-41

Jeder Patient, welcher sich in der Infertilitätssprechstunde vorstellte, wurde körperlich untersucht, hierbei wurde auch das Hodenvolumen bestimmt. Tabelle 9 gibt die Hodenvolumina in den einzelnen Gruppen wieder. Ebenfalls ergeben sich hier Unterschiede der Mittelwerte in den Gruppen, welche jedoch statistisch nicht signifikant sind. Gruppe 5 (Patienten mit Azoospermie und testikulärer Entzündung) weist mit einem Mittelwert des Hodenvolumens links von 12,1ml und rechts von 10,4ml jedoch ein erheblich niedrigeres Hodenvolumen im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die FSH-Werte (Mittelwerte) liegen in Gruppe 1 bei 4,4mU/ml, in Gruppe 3 bei 6,1mU/ml, in Gruppe 4 bei 6,2mU/ml, und in Gruppe 5 bei 15,5mU/ml. Somit liegt nur der Mittelwert der Gruppe 5 oberhalb der Normwerte (2-10mU/ml) für FSH.

Tabelle 9: Mittelwerte der Hodenvolumina (ml) in den verschiedenen Gruppen

	Hodenvolumen (Mittelwerte in ml)			
	Linker Hoden	Minimum- Maximum	Rechter Hoden	Minimum- Maximum
Kontrollgruppe	17,7	13-24	16,4	12-23
Gruppe 3	13,6	7-26	13,3	7-24
Gruppe 4	16,5	9-22	16,0	8-21
Gruppe 5	12,1	5-20	10,4	5-18

Ein weiterer Vergleich zwischen den Gruppen konnte auch im Bezug auf die Spermienkonzentration und die Spermiesamtzahl im Ejakulat gezogen werden. Tabelle 10 gibt die Werte der einzelnen Gruppen wieder. Hier weist Gruppe 5 die niedrigsten Werte, sowohl in der Spermienkonzentration, als auch in der Spermiesamtzahl auf.

Tabelle 10: Vergleich der Mittelwerte der Spermienkonzentration (Mio./ml) und der Mittelwerte der Spermiengesamtzahl (Mio.) im Ejakulat der unterschiedlichen Gruppen

	Spermienkonzentration (Mio./ml)	Minimum - Maximum	Spermiengesamtzahl (Mio.)	Minimum - Maximum
Kontrollgruppe 1	104,6	20-375	356	61-1242
Gruppe 3	4,7	0,1-13,5	10,6	10,4-29,7
Gruppe 4	32,6	0,31-160	118,1	1,5-880
Gruppe 5	0,9	0-8,6	0,8	0-8,6
Gruppe 6	23,1	0,8-100	78,2	0,4-360

Standardmäßig wird bei der Untersuchung des Ejakulats auch die polymorphkernige Leukozyten (PMN)-Elastasekonzentration im Seminalplasma bestimmt. Tabelle 11 gibt die Werte der verschiedenen Gruppen wieder. Der Normwert der PMN-Elastasekonzentration im Serum liegt < 250ng/ml. Die Kontrollgruppe weist hierbei die niedrigsten Werte auf und die Gruppe 4 (Patienten mit Samenwegsinfektion und/oder Samenwegsentzündung) liefert die höchsten Werte.

Tabelle 11: PMN-Elastasekonzentration im Ejakulat (Mittelwerte) der verschiedenen Gruppen

	PMN-Elastasekonzentration Mittelwert (ng/ml)
Kontrollgruppe 1	59,4
Gruppe 3	118,8
Gruppe 4	421,0
Gruppe 5	170,3
Gruppe 6	110,8

In den Gruppen wurden auch die verschiedenen Nebendiagnosen festgehalten (s. Abb. 10). Hier konnten nur die Nebendiagnosen der Gruppen 1, 3, 4, 5 und 6 (n=102) angegeben werden, da in den anderen Gruppen keine weiteren Daten bekannt sind. In Gruppe 6 (Patienten mit diagnostizierter testikulärer Entzündung bzw. Samenwegsentzündung, welche im Rahmen ihrer klinisch-andrologischen Betreuung mit entzündungshemmenden Medikamenten behandelt wurden) wurden unter der

Nebendiagnose Z.n. Samenwegsinfektion/-entzündung nicht die aktuell behandelte, sondern frühere in der Anamnese erhobene Befunde berücksichtigt. Am häufigsten (27%) findet sich die Nebendiagnose Varikozele Grad 1 (hämodynamisch nicht relevant) und am zweithäufigsten findet sich unter den Nebendiagnosen der Zustand nach (Z.n.) Malescensus testis.

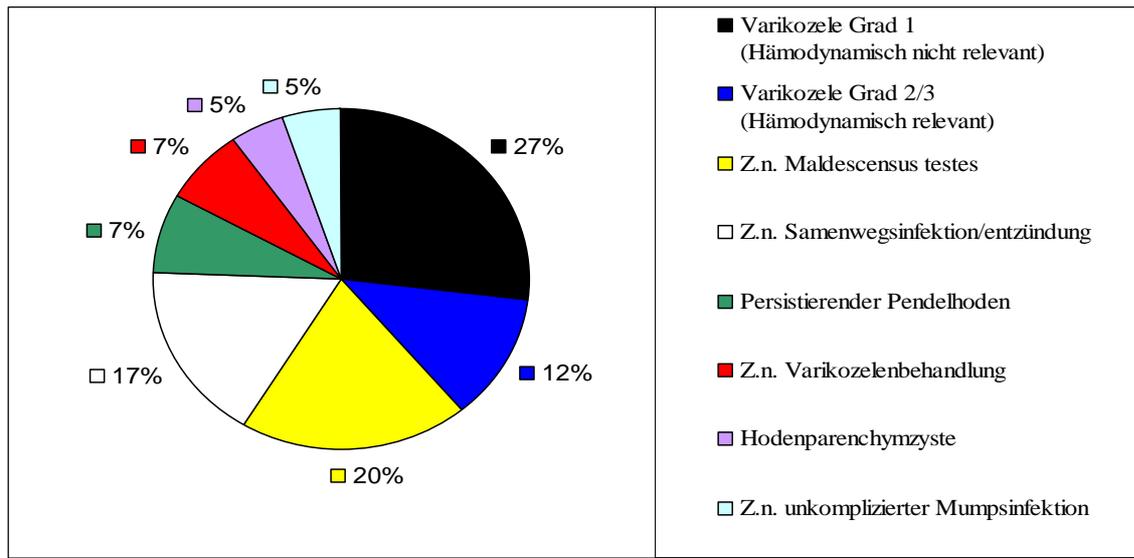


Abbildung 10. Kreisdiagramm mit Darstellung der Nebendiagnosen (prozentualer Anteil) der Patienten der unterschiedlichen Gruppen

3.2 Etablierung eines ELISA

In Vorarbeiten und Vorversuchen waren in der AG Prof. Meinhardt schon einige Schritte zur Etablierung des ELISA gemacht worden. Beispielsweise war es nicht nötig, verschiedene ELISA-Platten oder Sekundärantikörper auszutesten. Jedoch mussten Schritte des Versuchsablaufs (s. Kap. 3.2.1 -3.2.3) zur Etablierung und Optimierung des ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Disulfid-Isomerase ER-60 ausgewählt und getestet werden.

3.2.1 Auswahl der Beschichtungskonzentration

Zu Beginn der Versuche musste zuerst eine geeignete Beschichtungskonzentration für die ELISA-Platte gefunden werden. Die Platte wurde mit verschiedenen Beschichtungskonzentrationen: a) 2,5µg/ml b) 5µg/ml und c) 10µg/ml des rekombinant hergestellten ER-60 Proteins in Karbonatpuffer beschichtet und nach der Testdurchführung gemessen. Die Seren, welche bei diesen Versuchen gemessen wurden, stammten von Patienten mit histologisch gesicherter testikulärer Entzündung und aus einer Kontrollgruppe. Zudem wurde eine Messung des Leerwerts der Platte bei verschiedenen Beschichtungskonzentrationen durchgeführt. Letztlich stellte sich eine Beschichtungskonzentration in Höhe von 2,5µg/ml des rekombinant hergestellten ER-60-Proteins in Karbonatpuffer als optimal heraus (s. Abb. 11).

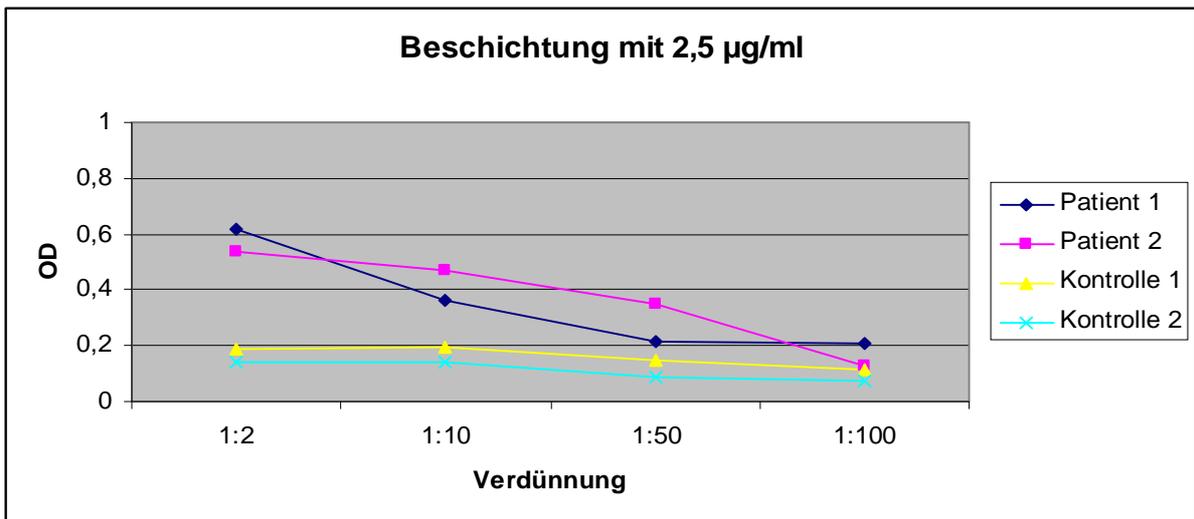
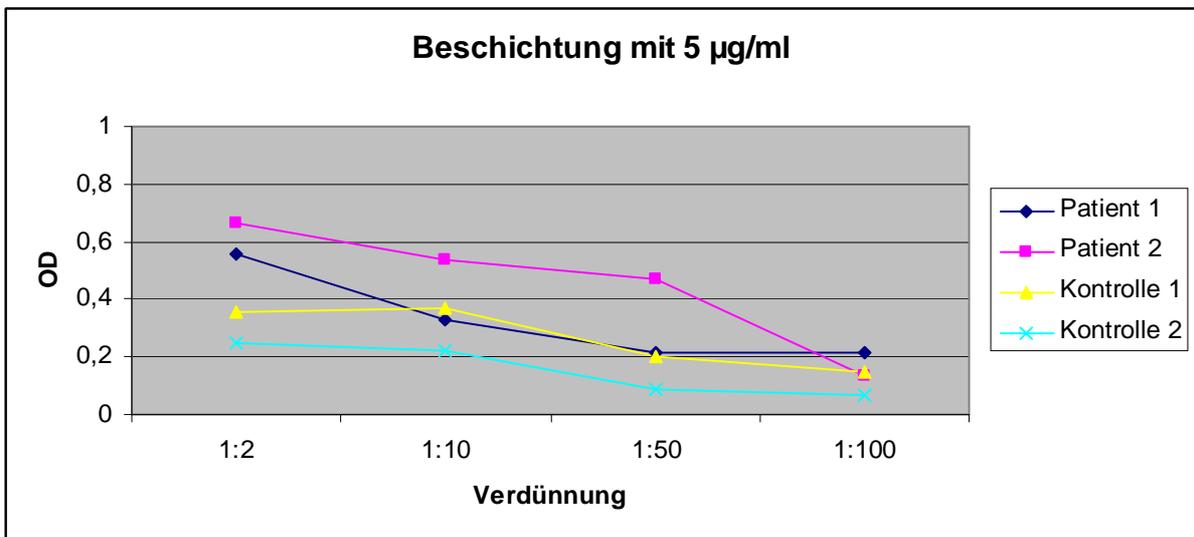
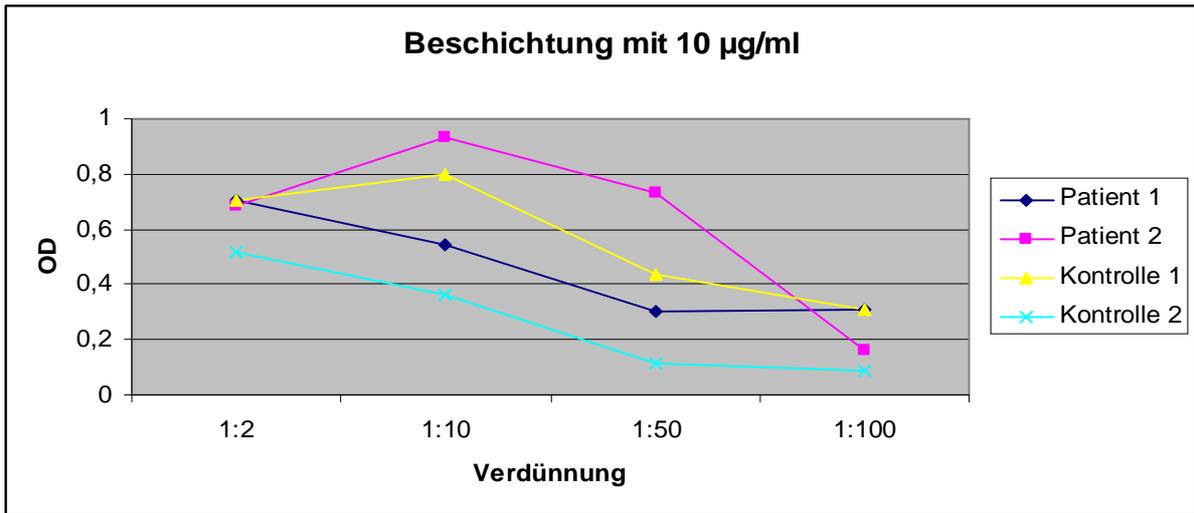


Abbildung 11. Vergleich der 3 verschiedenen ausgetesteten Beschichtungskonzentrationen von ER-60 (2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml)

3.2.2 Verdünnung des Standards

Um eine geeignete Verdünnung des Standards zu ermitteln, wurden verschiedene Verdünnungen des Standards in Blocklösung angewendet (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Die vier ausgetesteten Verdünnungsreihen des Standards (muriner monoklonaler Anti-ER-60-Antikörper)

(a)		(b)		(c)		(d)	
Konzentration (ng/μl)	Verdünnung	Konzentration (ng/μl)	Verdünnung	Konzentration (ng/μl)	Verdünnung	Konzentration (ng/μl)	Verdünnung
10	1: 100.000	100	1: 10.000	200	1: 5000	1000	1: 1000
5	1: 200.000	50	1: 20.000	100	1: 10.000	500	1: 2000
2,5	1: 400.000	25	1: 40.000	50	1: 20.000	250	1: 4000
1,25	1: 800.000	12,5	1: 80.000	25	1: 40.000	125	1: 8000
0,625	1: 1600.000	6,25	1: 160.000	12,5	1: 80.000	62,5	1: 16.000
0,3125	1: 3200.000	3,125	1: 320.000	6,25	1: 160.000	31,25	1: 32.000
0,15625	1: 6400.000	1,5625	1: 640.000	3,125	1: 320.000	15,625	1: 64.000

Dabei lieferte die Standardverdünnungsreihe (b) mit der Konzentration von 100 ng/μl bis zu einer Konzentration von 0,15625ng/μl Anti-ER-60-Antikörper in Blocklösung die besten Ergebnisse. Diese wurde bei jedem Versuch mitinkubiert.

3.2.3 Verdünnung der Proben

Um die optimale Verdünnung der Serumproben herauszufinden, wurden auch hier verschiedene Verdünnungen ausgetestet. Die Verdünnungsreihe, welche in Tabelle 4 abgebildet ist, mit einer unverdünnten Probe und einer Anfangsverdünnung von 1:2 bis zu einer Verdünnung von 1:1000 wurde bei der Testdurchführung angewendet. Wie Abbildung 12 zeigt, sind die Werte im Bereich der unverdünnten Serumproben und der

1:2 verdünnten Serumproben am besten geeignet, da diese Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen aufweisen.

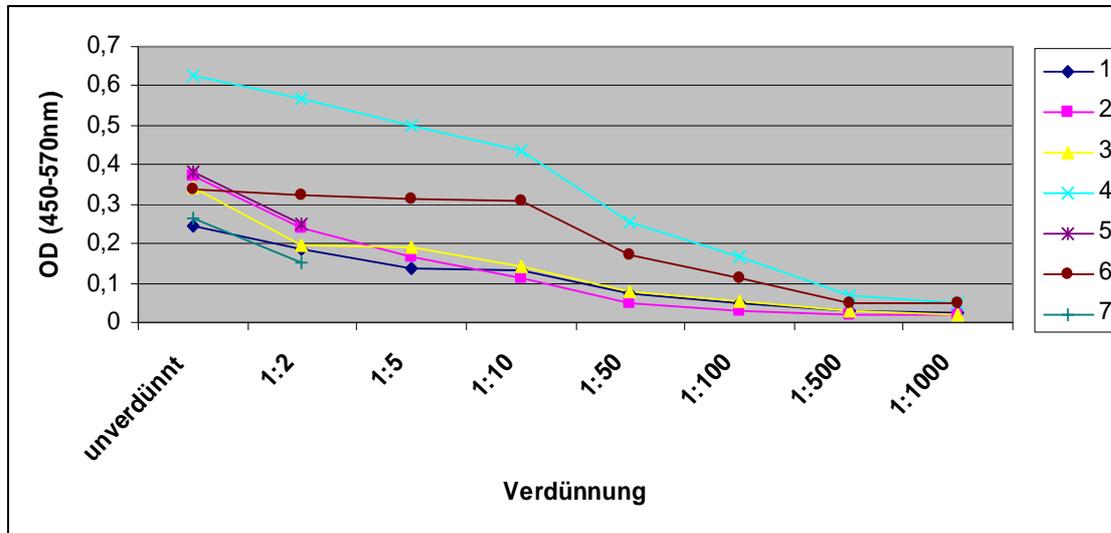


Abbildung 12. Darstellung der OD- Mittelwerte von allen Gruppen bei den verschiedenen getesteten Verdünnungen

3.3 Intra- und Inter-Assay-Variabilität des etablierten ELISA

Die Intra-Assay-Varianz betrachtet die Streuungen der Messwerte einer Probe innerhalb eines Versuchsansatzes (einer ELISA-Platte). Dazu wurde die achtfache Bestimmung einer unverdünnten Serumprobe (s. Tab. 13) eines Patienten auf einer ELISA-Platte durchgeführt. Anschließend wurde, zur Berechnung der Intra-Assay-Varianz, erneut der Variationskoeffizient errechnet. Dieser lag bei 12%.

Tabelle 13: Darstellung des Intra-Assay-Varianzkoeffizienten

	OD-Werte
	0,3415
	0,3728
	0,4074
	0,3592
	0,3755
	0,4243
	0,4404
	0,4772
Mittelwert	0,3998
Standardabweichung	0,0458
Intraassay-Varianzkoeffizient	0,1145

Bei der Betrachtung der Reproduzierbarkeit oder Inter-Assay-Variabilität eines Testsystems werden Schwankungen der Messergebnisse bei wiederholten Testungen mit jeweils konstanter Antigenkonzentration an unterschiedlichen Tagen wiedergegeben. Dazu wurde dieselbe Probe an verschiedenen Versuchstagen gemessen und dann bestimmt, wie weit die einzelnen Messwerte voneinander abwichen (s. Tab. 14). Anschließend wurde der Varianzkoeffizient, welcher für die Inter-Assay-Variabilität unter 11% lag, berechnet.

Tabelle 14: Darstellung der Werte des Inter-Assay-Varianzkoeffizienten

	OD-Werte
Tag 1	1,986
Tag 2	1,919
Tag 3	2,270
Tag 4	1,649
Tag 5	2,193
Tag 6	1,891
Tag 7	2,117
Tag 8	2,224
Tag 9	1,957
Tag 10	1,749
Tag 11	2,143
Tag 12	1,913
Tag 13	1,786
Tag 14	1,723
Tag 15	2,065
Tag 16	1,707
Mittelwert	1,956
Standardabweichung	0,198
Inter- Assay-Varianzkoeffizient	0,101

3.4 Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse: Sensitivität und Spezifität

Um bei diagnostischen Tests eine Entscheidung zwischen pathologischen und physiologischen Testergebnissen treffen zu können, müssen Schwellenwerte festgelegt werden. Für verschiedene Grenzwertwerte (cut-off-points) werden die jeweils zugeordneten Werte für Sensitivität und Spezifität gegeneinander aufgetragen. Trägt man für jeden Grenzwertwert den Anteil der falsch positiven (1-Spezifität) gegenüber den richtig positiven (Sensitivität) auf, so erhält man eine ROC-Kurve. Wird ein niedriger Grenzwertwert gewählt, werden viele „Kranke“ positiv, aber auch einige „Gesunde“ positiv ausgewertet, somit eine hohe Sensitivität, jedoch geringe Spezifität erreicht. Umgekehrt ergeben hohe gewählte Grenzwertwerte eine hohe Spezifität und eine geringere Sensitivität. Es gilt für einen Test den Wert zu finden, welcher gut zwischen „Kranken“ und „Gesunden“ diskriminiert. In dem entwickelten ELISA soll eine hohe Spezifität erreicht werden, da ein positiver Befund weitere Diagnostik und vor allem eine (evtl. nebenwirkungsreiche) Therapie nach sich zieht. Durch Ermittlung der Fläche unter der ROC-Kurve (AUC= area under the curve) lässt sich die Güte eines diagnostischen Tests ermitteln. Die Fläche unter der Kurve kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen. Eine AUC von 1 wird als ideal angesehen und schließt falsche Befunde aus.

Für den etablierten ELISA zum Nachweis von Autoantikörpern gegen ER-60 wurde in der ROC-Analyse ein Grenzwertwert der anti-ER-60-Konzentration in unverdünnten Serumproben von $< 6,974\text{ng/ml}$ gewählt. Dieser Grenzwertwert weist eine Sensitivität von 66,67% und eine Spezifität von 92,86% auf. Die Fläche unter der Kurve beträgt 0,8095. Das 95%-Konfidenzintervall dazu erstreckt sich von 0,668 bis 0,951. Die Abbildung 13 zeigt den zugehörigen Graphen. In Tabelle 15 sind alle möglichen Grenzwertwerte mit jeweiliger Sensitivität und Spezifität gelistet.

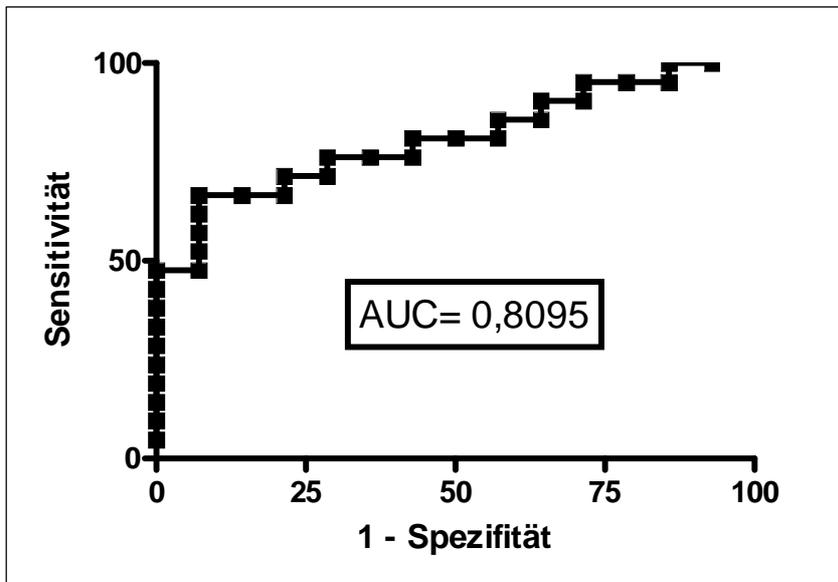


Abbildung 13. ROC-Kurve mit Grenzwertwerten der Anti-ER-60-Konzentration in unverdünnten Serumproben

Tabelle 15: Grenzwertwerte (Konzentration= ng/ml) der unverdünnten Serumproben mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität

Grenzwertwert (ng/ml)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
< 0.8272	4,762	100
< 1.016	9,524	100
< 1.415	14,29	100
< 1.759	19,05	100
< 1.954	23,81	100
< 2.136	28,57	100
< 2.528	33,33	100
< 3.001	38,1	100
< 4.028	42,86	100
< 4.924	47,62	100
< 5.080	47,62	92,86
< 5.820	52,38	92,86
< 6.545	57,14	92,86
< 6.764	61,9	92,86
< 6.974	66,67	92,86
< 7.138	66,67	85,71
< 7.636	66,67	78,57
< 8.278	71,43	78,57
< 8.511	71,43	71,43
< 8.575	76,19	71,43
< 8.821	76,19	64,29
< 9.112	76,19	57,14
< 9.261	80,95	57,14
< 9.332	80,95	50
< 9.435	80,95	42,86
< 9.654	85,71	42,86
< 10.76	85,71	35,71
< 11.81	90,48	35,71
< 12.53	90,48	28,57
< 13.40	95,24	28,57
< 14.64	95,24	21,43
< 16.59	95,24	14,29
< 28.78	100	14,29
< 46.23	100	7,143

3.5 Ergebnisse und statistische Auswertung der Gruppen

3.5.1 Werte und Gruppenvergleich der unverdünnten Serumproben

Für alle Gruppen wurden zunächst Median, Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

In der Kontrollgruppe 1 konnte bei insgesamt 21 Probanden ein Median der OD-Werte von 0,1725 (Mittelwert 0,2389) ermittelt werden. Minimum und Maximum lagen bei 0,052 und 0,676 und die Standardabweichung betrug 0,1569. Die Werte der Konzentration lieferten in dieser Kontrollgruppe einen Median von 3,366ng/ml, bei einem Mittelwert von 4,937ng/ml, einer Spannweite von 0,8543-13,17ng/ml und einer Standardabweichung von 3,612ng/ml.

In der zweiten Kontrollgruppe, mit ebenfalls 21 Probanden, ergaben sich für die OD folgende Werte; der Median lag bei 0,322, mit einem Minimum von 0,082 und einem Maximum von 0,790. Der Mittelwert war 0,333 mit einer Standardabweichung von 0,178. Bei der Konzentrationsbestimmung errechnete sich ein Median von 4,533ng/ml bei einer Spannweite zwischen 0,096- 11,41ng/ml, ein Mittelwert von 4,468ng/ml und eine Standardabweichung von 3,149ng/ml.

In Gruppe 3 (eingeschränkte Fertilität), welche 17 Patienten enthielt, lagen die OD-Werte für den Median bei 0,4035 bei einer Spannweite von 0,0600 bis 0,7210 und einem Mittelwert von 0,3907 bei einer Standardabweichung von 0,1788. Für die Konzentrationen dieser Gruppe ergaben sich ein Median bei 5,553ng/ml (Minimum-Maximum: 0,4680-34,23ng/ml), ein Mittelwert von 8,865ng/ml (Standardabweichung 9,072ng/ml).

Die Daten der Gruppe 4 (Samenwegsentzündung/-infektion) lieferten folgende OD-Werte: einen Median von 0,6250 (Mittelwert 0,5995), Spannweite 0,0530- 0,9000 und eine Standardabweichung von 0,1813. Die Konzentrationen in dieser Gruppe waren: Median 12,51ng/ml (Mittelwert: 12,14ng/ml), ein Minimum von 1,081 ng/ml und ein Maximum bei 35,59ng/ml, bei einer Standardabweichung von 6,855ng/ml.

In der Gruppe 5 war der Median 0,3009, der Mittelwert 0,3841, bei einer Standardabweichung von 0,235 und einer Spannweite zwischen 0,162 und 0,961 bei den OD-Werten. Die Werte der Konzentrationen ergaben einen Median von 9,33ng/ml

(Mittelwert: 14,82ng/ml), eine Spannweite 4,97- 52,45ng/ml und eine Standardabweichung von 13,80ng/ml.

Für Gruppe 6 ergaben sich ein Median von 0,3295 (Mittelwert 0,3473), ein Minimum und Maximum von 0,074 bzw. 0,600 und eine Standardabweichung von 0,1438 bei den OD-Werten. Die Werte der Konzentrationen ergaben: Median: 7,380ng/ml (Mittelwert: 7,355ng/ml), eine Spannweite zwischen 2,021- 11,19ng/ml, Standardabweichung 2,821ng/ml.

In der Gruppe 7 wurden die Werte von Patienten mit akuter, symptomatischer Epididymo-Orchitis gemessen. Für die OD-Werte ergab sich ein Median von 0,1972 (Mittelwert: 0,2396), ein Minimum von 0,1043, ein Maximum von 0,5010 und eine Standardabweichung von 0,1079. Bei den Werten der Konzentration lag der Median bei 7,371ng/ml, der Mittelwert bei 8,171ng/ml mit einer Standardabweichung von 4,924ng/ml und einer Spannweite von 2,642 bis 22,11ng/ml.

Bestimmung der OD-Werte in unverdünnten Serumproben

Nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests konnte für die OD-Werte der unverdünnten Proben ein p-Wert von <0.0001 und ein H-Wert von 52,96 ermittelt werden. Der daraufhin durchgeführte Gruppenvergleich mit Dunn's Multiple Comparison-Test erbrachte deutliche Unterschiede ($p<0,05$) zwischen den unten aufgelisteten Gruppen (Tab. 16).

Tabelle 16: Gruppenvergleich OD- Werte der unverdünnten Proben mit Dunn's Multiple Comparison-Test (n.s.= nicht signifikant)

Kontrollgruppe 1 vs Kontrollgruppe 2	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 3	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 4	$p < 0.001$	***
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 5	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 6	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 3	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 4	$p < 0.001$	***
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 5	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 6	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 4	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 5	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 6	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 4 vs Gruppe 5	$p < 0.05$	*
Gruppe 4 vs Gruppe 6	$p < 0.01$	**
Gruppe 4 vs Gruppe 7	$p < 0.001$	***
Gruppe 5 vs Gruppe 6	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 5 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 6 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.

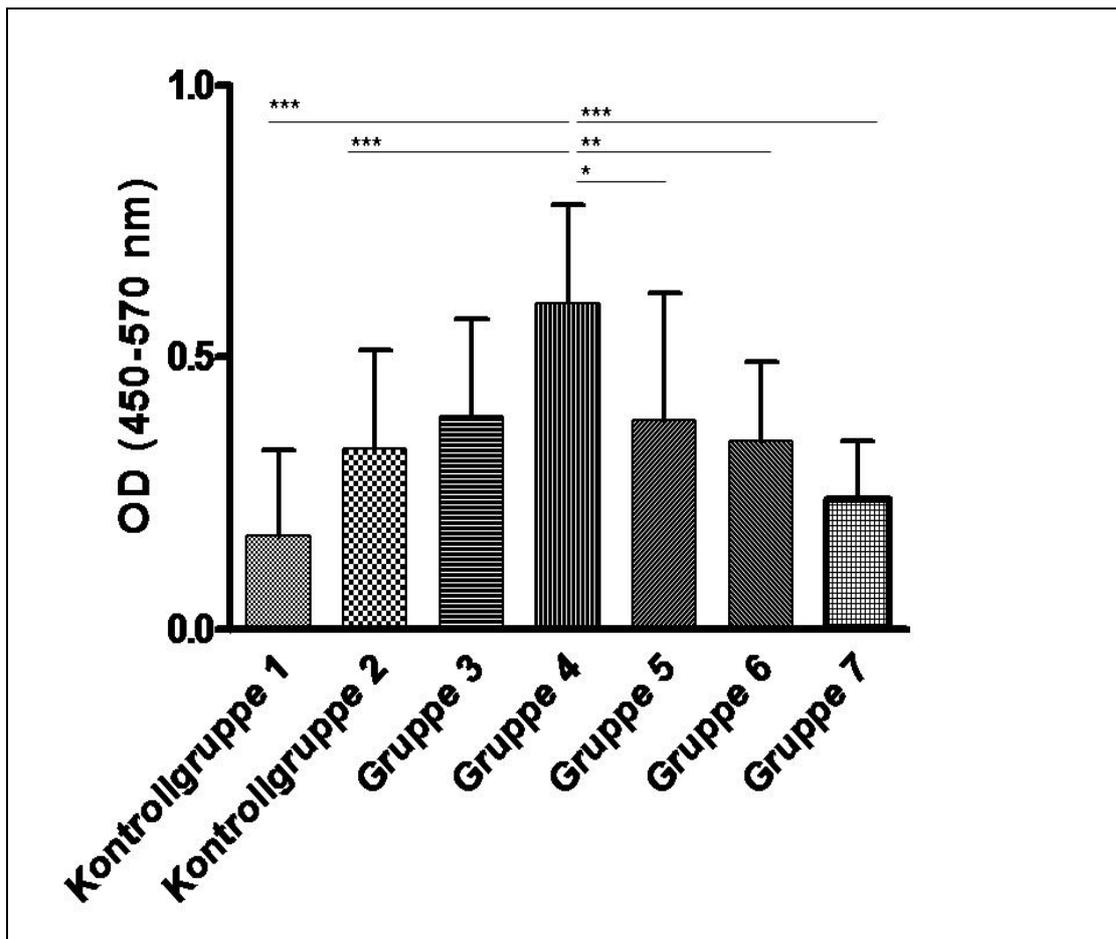


Abbildung 14: Vergleich der OD-Werte der unverdünnten Serumproben der einzelnen Gruppen mit Angabe des Mittelwertes (Säule), Signifikanz (***= $p < 0.001$, **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$) und Standardabweichung (oberhalb der jeweiligen Säule eingezeichnet).

Wie man dem Diagramm (Abb. 14) und der Tabelle entnehmen kann, sind erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar. Die Gruppe 4 (Patienten mit Samenwegsentzündung) erreicht hier die höchsten Werte und diese sind gegenüber der Gruppe 5 (Patienten mit histologisch gesicherter testikulärer Entzündung) schwach (*= $p < 0.05$), gegenüber der Gruppe 6 (Patienten nach antientzündlicher Behandlung) deutlich (**= $p < 0.01$) und gegenüber den beiden Kontrollgruppen und der Gruppe 7 (Patienten mit akuter, symptomatischer Epididymo-Orchitis) hoch signifikant (***= $p < 0.001$) erhöht. Zwischen den anderen Gruppen liegen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

Bestimmung der ER-60-Antikörper-Konzentration in unverdünnten Serumproben

Für die ermittelten ER-60-Konzentrationen der unverdünnten Serumproben ergab sich nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests ein p-Wert von <0.0001 und ein H- Wert von 42,79. Der daraufhin durchgeführte Gruppenvergleich mit Dunn's Multiple Comparison-Test erbrachte deutliche Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den unten aufgelisteten Gruppen (Tab. 17).

Tabelle 17: Gruppenvergleich der anhand eines Standards berechneten ER-60-Antikörper- Konzentrationen der unverdünnten Serumproben mit Dunn's Multiple Comparison-Test (n.s.= nicht signifikant)

Kontrollgruppe 1 vs Kontrollgruppe 2	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 3	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 4	$p < 0.001$	***
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 5	$p < 0.01$	**
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 6	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 3	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 4	$p < 0.001$	***
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 5	$p < 0.01$	**
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 6	$p > 0.05$	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 4	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 5	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 6	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 4 vs Gruppe 5	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 4 vs Gruppe 6	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 4 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 5 vs Gruppe 6	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 5 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.
Gruppe 6 vs Gruppe 7	$p > 0.05$	n.s.

Im Säulendiagramm (Abb. 15) wird ein hoch signifikanter ($p < 0.001$) Unterschied zwischen der Kontrollgruppe 1 und Gruppe 4 (Patienten mit Samenwegsentzündung), sowie zwischen Kontrollgruppe 2 und Gruppe 4 deutlich. Stark signifikant ($p < 0.01$) unterscheiden sich ebenfalls die Werte der Kontrollgruppen 1 und 2 gegenüber Gruppe 5 (Patienten mit testikulärer Entzündung).

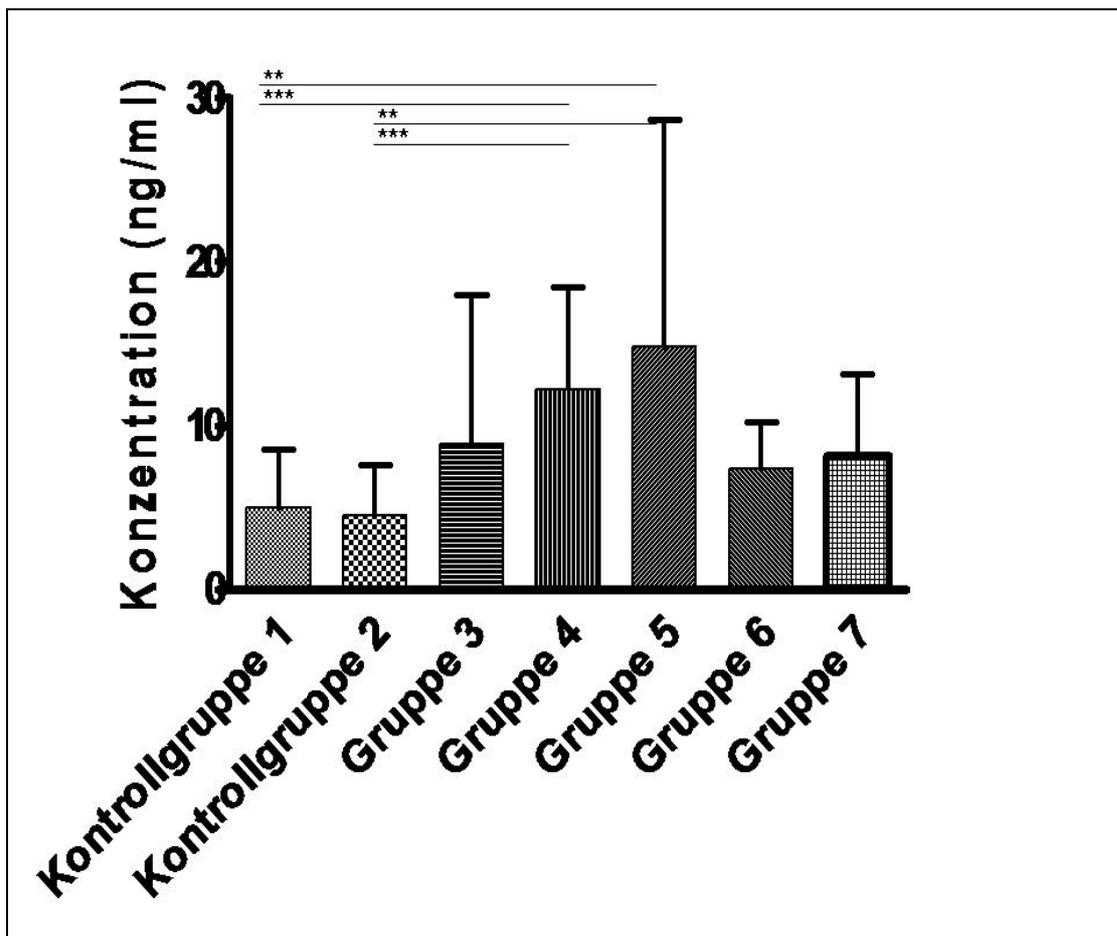


Abbildung 15. Vergleich der anhand eines Standards berechneten ER-60-Antikörper-Konzentrationen der unverdünnten Serumproben der einzelnen Gruppen mit Angabe des Mittelwertes (Säule) Signifikanz (**= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$, *= $p < 0.05$) und Standardabweichung (oberhalb der jeweiligen Säule eingezeichnet)

3.5.2 Werte und Gruppenvergleich der 1:2 verdünnten Serumproben

Die Werte der deskriptiven Statistik für OD und Konzentration von ER-60-Antikörpern der verschiedenen Gruppen bei einer Verdünnung von 1:2 sind in den Tabellen 18 und 19 dargestellt.

Tabelle 18: Deskriptive Statistik der anhand eines Standards berechneten ER-60-Antikörper- Konzentrationen der 1:2 verdünnten Serumproben aller Gruppen

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7
Median	3,526	1,775	2,571	12,43	9,090	7,86	4,292
Mittelwert	3,491	2,646	5,055	11,69	14,04	7,569	4,973
Standard-abweichung	2,111	3,034	5,366	5,350	7,440	4,094	3,114
Minimum	0,301	0,006	0,204	1,330	2,752	1,117	0,9299
Maximum	6,834	11,49	19,11	27,59	29,27	14,56	11,43

Tabelle 19: Deskriptive Statistik der OD-Werte der 1:2 verdünnten Serumproben aller Gruppen

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7
Median	0,1470	0,185	0,2495	0,5805	0,1879	0,3735	0,1191
Mittelwert	0,1624	0,2302	0,2576	0,5647	0,2476	0,3581	0,1564
Standard-abweichung	0,1119	0,1578	0,1364	0,2029	0,1628	0,1786	0,08266
Minimum	0,0385	0,061	0,03	0,0795	0,1042	0,067	0,046
Maximum	0,557	0,63	0,5265	0,851	0,619	0,657	0,316

Vergleich der Gruppen (1: 2 verdünnte Serumproben)

Auch für die verdünnten Proben wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt und für die OD- Werte der verdünnten Proben ein p-Wert von <0.0001 und ein H-Wert von 59,75 ermittelt. Der daraufhin durchgeführte Gruppenvergleich mit Dunn's Multiple Comparison- Test erbrachte auch bei den verdünnten Proben deutliche Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den unten aufgelisteten Gruppen (Tab. 20).

Tabelle 20: Gruppenvergleich der OD-Werte der verdünnten Serumproben mit Dunn's Multiple Comparison-Test (n.s. = nicht signifikant)

Kontrollgruppe 1 vs Kontrollgruppe 2	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 3	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 4	p < 0.001	***
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 5	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 6	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 7	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 3	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 4	p < 0.001	***
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 5	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 6	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 7	p > 0.05	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 4	p < 0.01	**
Gruppe 3 vs Gruppe 5	p > 0.05	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 6	p > 0.05	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 7	p > 0.05	n.s.
Gruppe 4 vs Gruppe 5	p < 0.01	**
Gruppe 4 vs Gruppe 6	p > 0.05	n.s.
Gruppe 4 vs Gruppe 7	p < 0.001	***
Gruppe 5 vs Gruppe 6	p > 0.05	n.s.
Gruppe 5 vs Gruppe 7	p > 0.05	n.s.
Gruppe 6 vs Gruppe 7	p < 0.05	*

Wie man auch dem unten aufgeführten Diagramm (Abb. 16) entnehmen kann, liegen die OD- Werte der Gruppe 4 auch hier am höchsten und unterscheiden sich hoch signifikant ($p < 0.001$) von den beiden Kontrollgruppen und Gruppe 7 (Patienten mit akuter, symptomatischer Epididymo- Orchitis), sowie stark signifikant ($p < 0.01$) von Gruppe 3 (Patienten mit eingeschränkter Fertilität) und Gruppe 5 (Patienten mit testikulärer Entzündung). Des Weiteren unterscheiden sich schwach signifikant ($p < 0.05$) die Gruppe 6 (Patienten nach antientzündlicher Behandlung) und Gruppe 7.

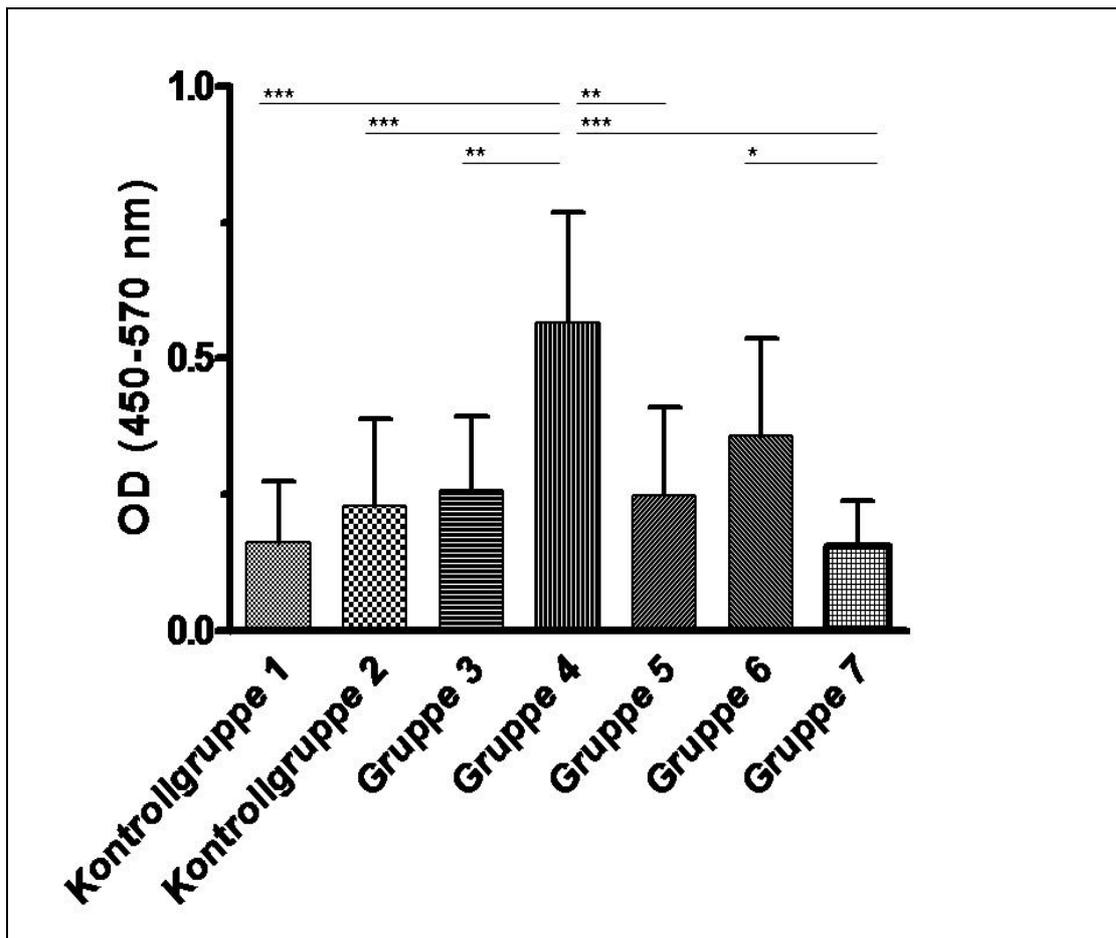


Abbildung 16. Vergleich der OD-Werte der 1:2 verdünnten Serumproben der einzelnen Gruppen mit Angabe des Mittelwertes (Säule), Signifikanz (***= $p < 0.001$, **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$) und Standardabweichung (oberhalb der jeweiligen Säule eingezeichnet)

Für die ermittelten ER-60-Konzentrationen der 1:2 verdünnten Proben ergab sich nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests ein p-Wert von <0.0001 und ein H-Wert von 63,91. Der anschließend durchgeführte Gruppenvergleich mit Dunn's Multiple Comparison-Test erbrachte deutliche Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den unten aufgelisteten Gruppen (Tab. 21).

Tabelle 21: Gruppenvergleich der anhand eines Standards errechneten ER-60-Antikörper- Konzentrationen der 1: 2 verdünnten Serumproben mit Dunn's Multiple Comparison-Test (n.s. = nicht signifikant)

Kontrollgruppe 1 vs Kontrollgruppe 2	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 3	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 4	p < 0.001	***
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 5	p < 0.001	***
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 6	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 1 vs Gruppe 7	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 3	p > 0.05	n.s.
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 4	p < 0.001	***
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 5	p < 0.001	***
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 6	p < 0.01	**
Kontrollgruppe 2 vs Gruppe 7	p > 0.05	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 4	p < 0.001	***
Gruppe 3 vs Gruppe 5	p < 0.05	*
Gruppe 3 vs Gruppe 6	p > 0.05	n.s.
Gruppe 3 vs Gruppe 7	p > 0.05	n.s.
Gruppe 4 vs Gruppe 5	p > 0.05	n.s.
Gruppe 4 vs Gruppe 6	p > 0.05	n.s.
Gruppe 4 vs Gruppe 7	p < 0.01	**
Gruppe 5 vs Gruppe 6	p > 0.05	n.s.
Gruppe 5 vs Gruppe 7	p < 0.05	*
Gruppe 6 vs Gruppe 7	p > 0.05	n.s.

Im Gruppenvergleich der Konzentrationen ergeben sich hoch signifikant ($p < 0.001$) unterschiedliche Werte zwischen den beiden Kontrollgruppen gegenüber den Gruppen 4 (Patienten mit Samenwegsentzündung) und 5 (Patienten mit testikulärer Entzündung, welche durch eine Hodenbiopsie gesichert wurde). Gruppe 4 zeigt gegenüber Gruppe 3 ebenfalls hoch signifikant ($p < 0.001$) unterschiedliche Werte. Stark signifikant ($p < 0.01$) ist der Unterschied zwischen der zweiten Kontrollgruppe und Gruppe 6 (Patienten nach antientzündlicher Behandlung) und Gruppe 7 (Patienten mit akuter, symptomatischer Epididymo-Orchitis). Die Gruppe 3 unterscheidet sich schwach signifikant von Gruppe

5 ($p < 0.05$). Die Gruppe 5 liefert schwach signifikant ($p < 0.05$) erhöhte Werte gegenüber Gruppe 7. Diese Unterschiede werden im Diagramm (Abb. 17) ersichtlich.

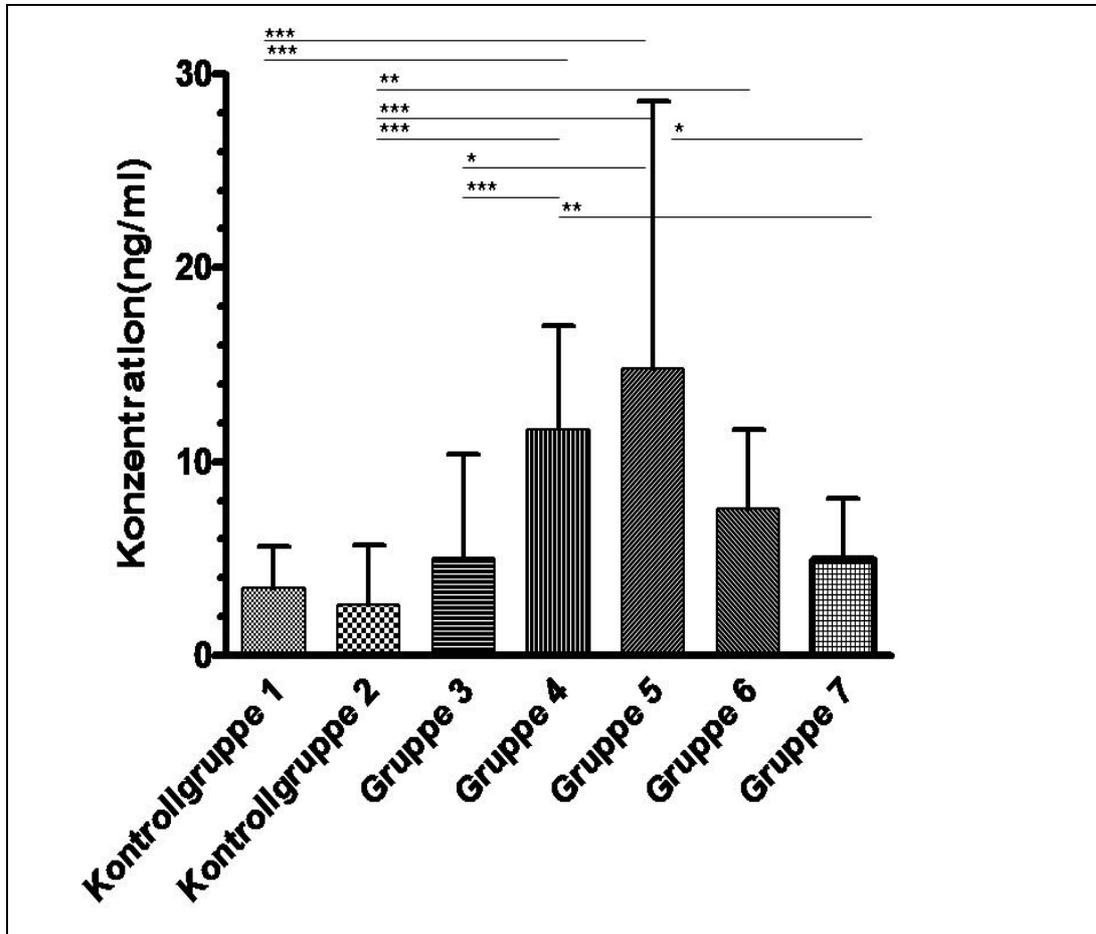


Abbildung 17. Vergleich der ER-60-Konzentrationen der 1:2 verdünnten Serumproben der einzelnen Gruppen mit Angabe des Mittelwertes (Säule), Signifikanz (***= $p < 0.001$, **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$) und Standardabweichung (oberhalb der jeweiligen Säule eingezeichnet)

4 Diskussion

Nach Schätzungen sind insgesamt ca. 80 Millionen Paare weltweit von Infertilität/Subfertilität betroffen. Die WHO rechnet weltweit mit einem Zuwachs von ca. zwei Millionen infertilen Paaren pro Jahr. Für die Industrienationen wird eine durchschnittliche Prävalenz der männlichen Infertilität von 10-14% angenommen [7, 64]. Bei der Hälfte der ungewollt kinderlosen Paare finden sich auch Fertilitätsstörungen beim Mann [50]. Für Deutschland liegen unterschiedliche und keine endgültig gesicherten Daten vor, aber es wird davon ausgegangen, dass in Deutschland etwa jedes sechste Paar von ungewollter Kinderlosigkeit betroffen ist [49].

Infektionen und Entzündungen des männlichen Genitaltraktes zählen zu den häufigsten Ursachen männlicher Fertilitätsstörungen. Es wird hierbei eine Prävalenz von 10–15% angegeben [66]. Insbesondere chronische und asymptomatische bzw. subklinische Entzündungsvorgänge im Hoden (Orchitis) und/oder Nebenhoden (Epididymitis) können zur Störung der Spermatogenese und Spermienqualität führen [80, 81].

In der Fertilitätsdiagnostik ist allerdings die Erfassung asymptomatischer und chronischer Entzündungsreaktionen des Hodengewebes schwierig. Im Gegensatz zur akuten Orchitis, welche allerdings Patienten in der Fertilitätssprechstunde praktisch nicht betrifft und die meist mit einer einseitigen, schmerzhaften Schwellung und Rötung des Skrotums und Allgemeinsymptomen (z.B. Nausea und Fieber) einhergeht [52, 53], ist die Klinik der chronischen Orchitis meist asymptomatisch. Unspezifische Symptome, wie Druckdolenz oder Verringerung des Hodenvolumens können vorkommen [81]. Es fehlen spezifische klinische und spermatologische Kriterien.

Die Basisdiagnostik beinhaltet die mikrobiologische Untersuchung des Ejakulats, gegebenenfalls auch von Prostatasekret, Urin und Urethralabstrichen. In einem Spermogramm werden unter anderem Spermienkonzentration, -motilität und -morphologie bestimmt. Die Entzündungsdiagnostik stützt sich vor allem auf den Nachweis von Erregern, die Bestimmung von Leukozytenzahlen und deren Differenzierung, PMN-Granulozytenelastase und proinflammatorische Zytokinen (z. B. Interleukin-6) [18, 29, 81]. Hierbei bleibt eine Beteiligung der Hoden meist unerkannt und zurzeit kann die definitive Diagnose bei Patienten mit chronischer, asymptomatischer Entzündung des Hodens daher nur histologisch, also mit Hilfe einer invasiven Hodenbiopsie gestellt werden. So bleibt häufig die Ursache (Entzündung) oder der Kofaktor der Fertilitätsstörung unbekannt [82]. Es ist möglich, dass ein Anteil der Patienten, welche

mit idiopathischer Infertilität klassifiziert wurden, Entzündungsvorgänge mit asymptomatischen Verlauf im Hoden aufweisen [82]. Vor diesem Hintergrund sollte ein eindeutiger, nicht-invasiver und routinemäßig durchführbarer Test zur Entzündungsdiagnostik bei infertilen Männern entwickelt werden, welcher eine schnelle und verlässliche Diagnostik ermöglicht und damit auch die Patienten einem frühzeitig einsetzendem und geeigneten Therapieregime zuführen kann.

Ein Ziel dieser Arbeit orientierte sich an der Frage, ob das in Vorarbeiten identifizierte testikuläre Autoantigen Protein-Disulfid-Isomerase ER-60 als diagnostischer Marker einer asymptomatischen testikulären Entzündung beim Mann dienen könnte. Nach Vorarbeiten zur Charakterisierung von Auto-Antigenen sowohl bei der tierexperimentellen Autoimmunorchitis als auch bei Patienten, bei denen durch eine Hodenbiopsie eine testikuläre Entzündung nachgewiesen wurde, sollte mit der vorliegenden Arbeit ein ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Protein-Disulfid-Isomerase ER-60 etabliert und überprüft werden, ob die gelieferten experimentellen Resultate bei einem breiten Patientenkollektiv aussagekräftig sind.

Die Protein-Disulfid-Isomerase ER-60 (Synonyme: ERp57, p58) ist ein lösliches 56 kDa Enzym, welches im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und in sekretorischen Zellen vorkommt [8]. Es katalysiert die korrekte Formation von Disulfid-Brücken in entstehenden Proteinen und ist als molekulares Chaperon auch für die Faltung und Stabilität der Proteine zuständig [55].

Im Rattenhoden fanden 1993 Ohtani et al. [68] eine Isoform von ER-60, welche im sich entwickelnden Spermatidenakrosom enthalten ist. Des Weiteren wurde beschrieben, dass ER-60 im Zellkern von Spermatiden, während der Maturation, sowie im Zellkern von Spermatozoen im Nebenhoden vorkommt.

2001 beschreiben Bohring et al. [5] die Identifikation und Isolation von Antigenen, welche in der Spermienmembran lokalisiert sind und von Spermatozoen-Antikörpern (ASA) erkannt werden. Neben anderen Proteinen wurde ER-60 dabei als Antigen auf der Spermienmembran gegen ASA identifiziert. ASA sind eine der Hauptursachen für immunologische Infertilität, da sie die Spermienfunktionen, durch Bindung an die Spermienmembran, stören.

Fijak et al. kommen 2005 zu dem Schluss, dass ER-60 und andere Proteine (z.B. Hsp-70) sehr wahrscheinlich zu den Hauptangriffspunkten von Autoimmunattacken im Hoden gehört.

In dieser Studie wurde eine EAO in Ratten induziert um die Moleküle zu identifizieren, welche die Autoimmunreaktion gegen den Hoden hervorrufen können. Dabei wurde die EAO erst durch aktive Immunisierung mit testikulärem Homogenat induziert. Anschließend wurden mit Hilfe von 2D SDS-PAGE und Massenspektrometrie sieben verschiedene Proteine identifiziert, unter anderem ER-60. Im nächsten Schritt wurde geprüft, in wie weit die gefundenen Proteine selbst eine testikuläre Autoimmunkrankheit hervorrufen können. Dazu wurden rekombinante Proteine zur Immunisierung einer zweiten Gruppe Ratten verwendet und eine EAO-Inzidenz von 25% in allen Gruppen festgestellt [23].

2009 finden Barderas et al. [4], dass eine Hochdosis-Therapie mit Atorvastatin zu einer Modifikation des Protein-Profiles der zirkulierenden Monozyten bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom führt. Auffällig ist, dass durch die Hochdosis-Therapie mit Atorvastatin die Expression von Proteinen, welche wie ER-60 eine inflammatorische und thrombogene Wirkung haben, normalisiert werden.

Dong et al. demonstrieren ebenfalls 2009, dass ER-60 in die Regulierung der Apoptosevorgänge in menschlichen Endothelzellen eingreifen kann und durch "knock-down" von ER-60 ein Schutz gegen Hyperoxie- und Tunicamycin-induzierte Apoptose geschaffen wird [94].

Die vorliegende Arbeit umfasst eine Gruppe von 142 Männern, welche je nach Diagnose in sieben verschiedene Gruppen eingeteilt wurden und welche aus verschiedenen Kliniken bzw. Instituten des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Gießen (Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie und Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie) und des Universitätsklinikums der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Sektion Andrologie) stammten. Von diesen 142 Patienten waren 42 Männer in Kontrollgruppe 1 und 2, 17 Probanden wiesen eine eingeschränkte Fertilität (Gruppe 3) auf und 32 Probanden erfüllten die Kriterien einer Samenwegsentzündung (Gruppe 4). Weitere 14 Patienten wiesen eine mittels Hodenbiopsie gesicherte testikuläre Entzündung auf (Gruppe 5) und 18 Patienten wurden nach diagnostizierter Samenwegsentzündung mit entzündungshemmenden Medikamenten

(Gruppe 6) behandelt. Eine siebte Gruppe bestand aus 19 Patienten aus der urologischen Sprechstunde mit akuter Epididymo-Orchitis (Gruppe 7).

Die Ergebnisse sind im direkten Vergleich aller sieben Kontroll- und Patientengruppen in Abbildung 14- 17 zu sehen.

Im Gruppenvergleich der Konzentrationen der unverdünnten Serumproben (Abb. 15) wird ein hoch signifikanter ($p < 0.001$) Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen und der Gruppe 4 (Patienten mit Samenwegsentzündung/-infektion) deutlich. Stark signifikant ($p < 0.01$) unterscheiden sich ebenfalls die Werte der Kontrollgruppen 1 und 2 gegenüber Gruppe 5 (Patienten mit testikulärer Entzündung).

Im Gruppenvergleich der Konzentrationen der verdünnten Serumproben ergeben sich hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) zwischen den beiden Kontrollgruppen gegenüber den Gruppen 4 und 5. Stark signifikant ($p < 0.01$) ist ebenfalls der Unterschied zwischen der zweiten Kontrollgruppe und Gruppe 6. Der Unterschied der Gruppe 4 gegenüber Gruppe 3 und Gruppe 7 ist hoch ($p < 0.001$) bzw. stark signifikant ($p < 0.01$). Die Gruppe 5 liefert schwach signifikant ($p < 0.05$) erhöhte Werte gegenüber Gruppe 3 und 7. Diese Unterschiede werden im Diagramm (Abb. 17) ersichtlich.

Die höchsten Titer ER-60-spezifischer Antikörper fanden sich in verdünnten und unverdünnten Serumproben bei infertilen Männern mit asymptomatischer testikulärer Entzündung (Gruppe 5). Am zweithöchsten waren die Antikörpertiter in der Gruppe 4. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Patienten mit asymptomatischer, durch Hodenbiopsie gesicherter, testikulärer Entzündung gegenüber gesunden Patienten signifikant erhöhte Antikörpertiter gegen ER-60 nachzuweisen sind.

Signifikant niedrigere Titer wurden dagegen in den übrigen Kollektiven gemessen, mit einem Minimum in der Kontrollgruppe normozoospermer Männer und bei gesunden Männern mit unbekanntem Fertilitätsstatus ($p < 0.001$).

Des Weiteren fand sich in verdünnten Serumproben ein stark signifikanter ($p < 0.01$) und ein schwach signifikanter ($p < 0.05$) Unterschied zwischen den Antikörpertitern von Männern mit Samenwegsentzündung/-infektion und Patienten mit testikulärer Entzündung gegenüber Patienten mit akuter Epididymo-Orchitis. Dies mag sich durch die frühe Vorstellung der Patienten mit akuter Epididymo-Orchitis in der Sprechstunde erklären, da diese sehr häufig symptomatisch verläuft und die Patienten sich zeitnah in der urologischen Sprechstunde vorstellen. Die Blutentnahme folgte jeweils am ersten

Vorstellungstag in der Sprechstunde und somit in einer sehr frühen Phase in Bezug auf die mögliche Antikörperbildung gegen ER-60.

Die Patienten mit eingeschränkter Fertilität unterscheiden sich ebenfalls hoch signifikant ($p < 0.001$) gegenüber Patienten mit Samenwegsentzündung/-infektion und schwach signifikant ($p < 0.05$) gegenüber Patienten mit testikulärer Entzündung.

Die ER-60-Antikörpertiter der anderen Gruppen (Männer mit eingeschränkter Fertilität, Patienten nach antientzündlicher Therapie, Patienten mit akuter Epididymo-Orchitis) unterscheiden sich (bis auf die Ergebnisse der verdünnten Serumproben der Kontrollgruppe 2 gegenüber Gruppe 6) nicht signifikant von den beiden Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Serumproben von Patienten mit testikulären Entzündungen sehr häufig hohe ER-60-Antikörpertiter aufweisen und sich damit von gesunden Probanden oder Männern mit nicht-entzündlichen Spermatogeneschäden abgrenzen lassen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie zeigen weiterhin, dass ER-60 auch im humanen System ein relevantes Antigen darstellt, gegen das erhöhte Titer bei Patienten mit Entzündungsprozessen in Genitaltrakt Autoantikörper induziert werden. Der Nachweis erhöhter Titer ER-60-spezifischer Autoantikörper ist somit möglicherweise als diagnostischer Marker für asymptomatische inflammatorische Prozesse im Hoden und/oder der ableitenden Samenwege von infertilen Männern geeignet. Der entwickelte und etablierte ELISA könnte so zu einer neuen und nicht-invasiven Methode zur Aufklärung von asymptomatischen, testikulären Entzündungsreaktionen bei idiopathischer männlicher Infertilität werden.

Methodenkritik

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ELISA zum Nachweis von Autoantikörpern gegen die ER-60 etabliert. Protokoll und genauere Angaben zu dem etablierten ELISA finden sich im Kapitel 2 Material und Methoden. Es wurde gezeigt, dass diese Methode für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Autoantikörpern gegen ER-60 geeignet ist.

Bei weitergehenden Untersuchungen sollten methodenspezifische Werte wie Grenzwert, Spezifität und Sensitivität an größeren Patientenkollektiven auch im Rahmen einer multizentrischen Studie bestätigt werden.

Probenlagerung

Damit im klinischen Alltag verlässliche und optimale Messwerte erreicht werden können, ist es wichtig, dass der Ablauf von Gewinnung, Lagerung und Verwendung der Seren einheitlich und nach vorgegebenen Richtlinien verläuft. Unter Kapitel 2.3.1 wurde der Ablauf der Probengewinnung aufgezeigt. In der vorliegenden Studie liegen Schwankungen im Bezug auf die Lagerungsdauer der Proben vor, da wenige Proben schon aus dem Jahr 2008 stammten und andere erst wenige Tage vor der Verwendung abgenommen wurden. In Zukunft sollte darauf geachtet werden, dass die Lagerungszeit der verwendeten Proben möglichst kurz gehalten wird und die Seren zeitnah vor Verwendung des Tests abgenommen werden. Es sollte weiterhin auf eine einheitliche Lagerung bei -80°C geachtet werden und Proben nicht mehrmals aufgetaut und eingefroren werden.

Unterschiede zwischen Resultaten in OD-Werten und Konzentrationsangaben

Die Ergebnisse der Antikörperkonzentrationen wurden in jeder Versuchsreihe anhand des mitinkubierten Standards, wie unter Kapitel 2.3.4.2 beschrieben, errechnet. Durch Verwendung von diesem internen Standard wurden die Resultate der Antikörperkonzentrationen in jeder Versuchsreihe normalisiert. Demgegenüber stehen die Ergebnisse der optischen Dichte. Hier kann beispielsweise schon durch kleinste Unterschiede in der Inkubationszeit in den Versuchsreihen eine abweichende Intensität der Farbreaktion auftreten. Durch das festgelegte und verwendete Versuchsprotokoll sollten solche Abweichungen minimal sein, jedoch kann es zu geringen Abweichungen in den einzelnen Versuchsreihen kommen.

Daher sind die Resultate der Antikörperkonzentrationen besser reproduzierbar und liefern die besten Ergebnisse, da sie weniger störanfällig wie die Ergebnisse der optischen Dichte sind.

Patientenauswahl

Die Patienten mit akuter Epididymo-Orchitis der Gruppe 7 stellen ein etwas anderes Patientenprofil dar, als die Patienten aus den anderen Gruppen. Das Durchschnittsalter ist mit 51,8 Jahren deutlich gegenüber den anderen Gruppen erhöht (s. Tabelle 7). Dies ist nicht überraschend, da die akute Epididymo-Orchitis häufig ältere Patienten mit urogenitalen Infekten betrifft. Ein weiterer unterscheidender Punkt zwischen diesem

Patientenkollektiv und den anderen Gruppen ist, dass hier kein Kinderwunsch bestand, sondern dass diese Patienten die urologische Sprechstunde aufgrund von akuten Beschwerden aufsuchten. Von diesen Patienten sind nur wenige weitere klinisch-andrologische Daten vorhanden, so dass sie nicht direkt mit den anderen Gruppen verglichen werden konnten im Bezug auf diese Parameter. Dennoch erschien es sinnvoll diese Gruppe mit in diese Studie aufzunehmen und im Vergleich zu den anderen Gruppen zu sehen, ob erhöhte ER-60-Antikörper-Konzentrationen festgestellt werden.

5 Zusammenfassung

Nachweis von Autoantikörpern gegen ER-60 bei Männern mit entzündlich bedingten Fertilitätsstörungen- eine Pilotstudie

Einleitung: Infektionen oder Entzündungen des Genitaltraktes (IEG) zählen zu den häufigsten Ursachen männlicher Fertilitätsstörungen. Ausgehend von einer hohen Rate primär chronischer, asymptomatischer Verläufe ist die Diagnostik jedoch häufig unbefriedigend. Diese stützt sich vor allem auf den Nachweis von Erregern, erhöhten Leukozytenzahlen, sowie Entzündungsmediatoren im Ejakulat. Hierbei bleibt eine Hodenbeteiligung zumeist unerkannt, wenn keine Biopsie vorgenommen wird. In Vorversuchen konnten drei Proteine (ER-60, Transferrin, TCP-1) identifiziert werden, gegen die gehäuft Antikörper in Seren von Männern mit IEG gerichtet waren. Eines dieser Autoantigene ist die Disulfid-Isomerase ER-60, die auch im tierexperimentellen Modell der chronischen Orchitis der Ratte gefunden wurde.

Material und Methoden: Zur Etablierung eines ELISA wurde rekombinantes humanes ER-60-Protein hergestellt. Serumproben folgender Kollektive wurden untersucht: Gesunde Männer mit Normozoospermie (n= 21, Kontrollgruppe 1); Männliche Blutspender (n=21, Kontrollgruppe 2); Patienten mit eingeschränkter Ejakulatqualität (Spermienkonzentration unter 15 Mio./ml) ohne IEG (n=17, Gruppe 3); Patienten mit IEG (n=32, Gruppe 4); Patienten mit histologisch gesicherter testikulärer Entzündung (n=14, Gruppe 5); Patienten nach antiinflammatorischer Pharmakotherapie der IEG (n= 18, Gruppe 6); Patienten mit akuter Epididymo- Orchitis (n=19, Gruppe 7).

Ergebnisse: Die höchsten Titer ER-60- spezifischer Antikörper fanden sich bei infertilen Männern mit histologisch gesicherter testikulärer Entzündung (Gruppe 5), gefolgt von Patienten mit IEG (Gruppe 4). Signifikant niedrigere Titer wurden dagegen in den übrigen Kollektiven gemessen, mit einem Minimum in den beiden Kontrollgruppen ($p < 0.001$).

Schlussfolgerungen: ER-60 stellt auch im humanen System ein relevantes Antigen dar, gegen das bei Patienten mit Entzündungsprozessen im Genitaltrakt erhöhte Autoantikörper-Titer induziert werden. Erhöhte Titer ER-60-spezifischer Antikörper sind somit möglicherweise als nicht-invasiver diagnostischer Marker geeignet.

6 Summary

Auto-antibodies against disulphide isomerase ER-60 as a possible diagnostic marker in male immunological infertility

Inflammation and infection of the male genital tract have been reported in up to 15% of cases as main aetiologies of male fertility disturbances. In the majority of these patients, however, diagnosis is hampered by an asymptomatic course of the disease, especially subacute or chronic inflammatory conditions in the testis and/ or epididymis remain obscure. Definitive diagnosis of suspected chronic testicular inflammation is based only on invasive testicular biopsy. In preliminary tests we have identified three proteins (ER-60, transferrin, TCP-1) as immunodominant antigens recognized by auto-antibodies in sera from patients with testicular inflammation.

To establish an immunodiagnostic assay recombinant human ER-60 was selected and used for an ELISA development. Sera from the following groups were screened: healthy normozoospermic men (n= 21, control group 1); male blood donors (n=21, control group 2); patients with impaired semen quality (sperm concentration <15 mil./ml) without symptoms of genital tract infection/inflammation (n=17, group 3); patients with symptoms of genital tract infection/inflammation (n=32, group 4); patients with chronic testicular inflammation confirmed by testicular biopsy (n=14, group 5); patients after pharmacotherapy of genital tract infection/inflammation (n=18, group 6); patients with acute epididymo-orchitis (n= 19, group 7).

Significantly increased ($p < 0.001$) titers of auto-antibodies against ER-60 were found in the sera from infertile men in group 5 followed by group 4. Anti-ER60 antibody titers were significantly decreased ($p < 0.001$) in serum samples from normozoospermic men or healthy men with unknown fertility status (control groups 1 and 2).

Our preliminary results show that determination of ER-60 auto-antibodies in male serum may be a promising marker for the diagnosis of asymptomatic inflammatory processes in the testis and/or excurrent ducts.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
ASA	Spermatozoen-Antikörper (antisperm antibodies)
C	Celsius
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD68	Cluster of Differentiation 68
CD8	Cluster of Differentiation 8
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EAO	Experimentelle Autoimmun-Orchitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme- linked Immunosorbent Assay
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (high pressure liquid chromatograph)
Hsp	Hitzeschockprotein
IEG	Infektionen und Entzündungen des Genitaltraktes
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Iso-propyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LH	Lutenisierendes Hormon
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MIF	Makrophagen-Migrations-inhibitorischer-Faktor
mM	Millimol
n	Umfang der Stichprobe
NaCl	Natriumchlorid

NK- Zellen	Natürliche Killer Zellen
OD _{xy}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xy nm
p	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
pH	pondus Hydrogenii
PMN	Polymorphkernige Neutrophile (Polymorphonuclear neutrophils)
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
ROC	Receiver-Operating-Characteristics
rpm	Umdrehung pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCP-1	T-complex protein 1
TGF	Transforming Growth Faktor
TMB	3,3', 5,5' Tetramethylbenzidine
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Morphologie des Hoden	4
Abbildung 2. Ätiologische Faktoren und Pathogenese der chronischen, asymptomatischen Inflammation im humanen Hoden	18
Abbildung 3. ELISA: Direkter und indirekter Nachweis von Antigenen	32
Abbildung 4. ELISA: Kompetitive Assays.....	32
Abbildung 5. Prinzip eines Sandwich- ELISA	33
Abbildung 6. Prinzip und Versuchsablauf eines nichtkompetitiven ELISA	35
Abbildung 7. Plattenbelegung der ELISA-Platte.....	38
Abbildung 8. Schema Herstellung Standardverdünnungsreihe	39
Abbildung 9. Beispiel einer Standardkurve mit Regressionsgeraden	40
Abbildung 10. Kreisdiagramm mit Darstellung der Nebendiagnosen	48
Abbildung 11. Vergleich der ausgetesteten Beschichtungskonzentrationen	50
Abbildung 12. Darstellung der OD- Mittelwerte aller Gruppen bei verschiedenen Verdünnungen	52
Abbildung 13. ROC-Kurve	56
Abbildung 18. Vergleich der OD-Werte der unverdünnten Serumproben.....	59
Abbildung 15. Vergleich der ER-60-Antikörper-Konzentrationen der unverdünnten Serumproben	63
Abbildung 16. Vergleich der OD-Werte der verdünnten Serumproben.....	66
Abbildung 17. Vergleich der ER-60-Konzentrationen der verdünnten Serumproben..	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ätiologische Faktoren bei männlichen Fertilitätsstörungen	15
Tabelle 2: Referenzwerte für ein Spermogramm nach WHO 2010.....	23
Tabelle 3: Antikörper und Enzyme	27
Tabelle 4: Pipettierschema der Serienverdünnungsreihe.....	28
Tabelle 5: Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe	29
Tabelle 6: Übersicht über die Probanden- und Patientengruppen.....	42
Tabelle 7: Anzahl und Alter der Patienten in den unterschiedlichen Gruppen.....	45
Tabelle 8: Dauer des Kinderwunsches und Alter der Partnerin der Patienten.....	45
Tabelle 9: Mittelwerte der Hodenvolumina in den verschiedenen Gruppen	46
Tabelle 10: Vergleich der Mittelwerte der Spermienkonzentration und der Mittelwerte der Spermiengesamtzahl im Ejakulat	47
Tabelle 11: PMN-Elastasekonzentration im Ejakulat	47
Tabelle 12: Die vier ausgetesteten Verdünnungsreihen des Standards	51
Tabelle 13: Darstellung des Intra-Assay-Varianzkoeffizienten.....	53
Tabelle 14: Darstellung der Werte des Inter-Assay-Varianzkoeffizienten.....	54
Tabelle 15: Grenzwertwerte.....	57
Tabelle 16: Gruppenvergleich OD- Werte der unverdünnten Proben.....	60
Tabelle 17: Gruppenvergleich der anhand eines Standards berechneten ER-60- Antikörper- Konzentrationen der unverdünnten Serumproben.....	62
Tabelle 18: Deskriptive Statistik der anhand eines Standards berechneten ER-60- Antikörper-Konzentrationen verdünnten Serumproben	64
Tabelle 19: Deskriptive Statistik der OD-Werte der verdünnten Serumproben	64
Tabelle 20: Gruppenvergleich der OD-Werte der verdünnten Serumproben.....	65
Tabelle 21: Gruppenvergleich der anhand eines Standards errechneten ER-60- Antikörper- Konzentrationen der verdünnten Serumproben.....	67

Literaturverzeichnis

- 1 *Adamopoulos DA, Lawrence DM, Vassilopoulos P, Contoyiannis PA, Swyer GI.* Pituitary-testicular interrelationships in mumps orchitis and other viral infections. *Br Med J* 1978; 1(6121): 1177 – 1180
- 2 *Andrada JA, Walde F von der, Hoschoian JC, Comini E, Mancini E.* Immunological studies in patients with mumps orchitis. *Andrologia* 1977; 9(3): 207 – 215
- 3 *Apa D, Cayan S, Polat A, Akbay E.* Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch. Androl.* 2002; 48(5): 337 – 344
- 4 *Barderas MG, Tuñón J, Dardé VM et al.* Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome. *Proteomics* 2009; 9(7): 1982 – 1993
- 5 *Bohring C, Krause E, Habermann B, Krause W.* Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol. Hum. Reprod.* 2001; 7(2): 113 – 118
- 6 *Bohring C, Krause W.* Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis. *Hum. Reprod.* 2003; 18(5): 915 – 924
- 7 *Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG.* International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction* 2007; 22(6): 1506 – 1512
- 8 *Cai H, Wang CC, Tsou CL.* Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(40): 24550 – 24552
- 9 *Caussanel V, Tabone E, Hendrick JC, Dacheux F, Benahmed M.* Cellular distribution of transforming growth factor betas 1, 2, and 3 and their types I and II receptors during postnatal development and spermatogenesis in the boar testis. *Biol. Reprod.* 1997; 56(2): 357 – 367
- 10 *Cooper TG et al.* World Health Organization reference values for human semen. *Human Reproduction Update* 2010;(16): 231 – 245
- 11 *Cropp CS, Schlaff WD.* Antisperm antibodies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 1990; 38(1-2): 31 – 46
- 12 *de Kretser D. M.* Male infertility. *Lancet* 1997; 349: 787 – 790

- 13 *Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W.* Influence of urogenital infection on sperm function. *Current opinion in urology* 2000; 10(1): 39 – 44
- 14 *Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W.* EAU guidelines on male infertility. *Eur. Urol.* 2005; 48(5): 703 – 711
- 15 *Domagala A, Kurpisz M.* Immunoprecipitation of sperm and somatic antigens with antibodies from sera of sperm-sensitized and anti-sperm antibody-free individuals. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2004; 51(3): 226 – 234
- 16 *Dörr H, Bohring C, Krause W.* Are antisperm antibodies indeed sperm-specific? *Andrologia* 2005; 37(5): 185 – 187
- 17 *Duan Y, Yu C, Novak N et al.* Immunodeviation towards a Th17 immune response associated with testicular damage in azoospermic men. *International journal of andrology* 2011;
- 18 *Eggert-Kruse W, Zimmermann K, Geissler W, Ehrmann A, Boit R, Strowitzki T.* Clinical relevance of polymorphonuclear (PMN-) elastase determination in semen and serum during infertility investigation. *Int. J. Androl.* 2009; 32(4): 317 – 329
- 19 *el-Demiry MI, Hargreave TB, Busuttil A, Elton R, James K, Chisholm GD.* Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertil. Steril.* 1987; 48(3): 470 – 479
- 20 *el-Demiry MI, Hargreave TB, Busuttil A, James K, Ritchie AW, Chisholm GD.* Lymphocyte sub-populations in the male genital tract. *British journal of urology* 1985; 57(6): 769 – 774
- 21 *Elhija MA, Potashnik H, Lunenfeld E et al.* Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. *Eur. Cytokine Netw.* 2005; 16(2): 167 – 172
- 22 *Engvall E, Jonsson K, Perlmann P.* Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim. Biophys. Acta* 1971; 251(3): 427 – 434
- 23 *Fijak M, Iosub R, Schneider E et al.* Identification of immunodominant autoantigens in rat autoimmune orchitis. *J. Pathol.* 2005; 207(2): 127 – 138
- 24 *Fijak M, Meinhardt A.* The testis in immune privilege. *Immunol. Rev.* 2006; 213: 66 – 81
- 25 *Filippini A, Riccioli A, Padula F et al.* Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum. Reprod. Update* 2001; 7(5): 444 – 449

- 26 *Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L et al.* Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil. Steril.* 2002; 78(2): 298 – 306
- 27 *Gaytan F, Carrera G, Pinilla L, Bellido C.* Mast cells in the testis, epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *J. Androl* 1989;(10): 351 – 358
- 28 *Goddard I, Bouras M, Keramidas M, Hendrick JC, Feige JJ, Benahmed M.* Transforming growth factor-beta receptor types I and II in cultured porcine leydig cells: expression and hormonal regulation. *Endocrinology* 2000; 141(6): 2068 – 2074
- 29 *Haidl G, Allam JP, Schuppe H.* Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia* 2008; 40(2): 92 – 96
- 30 *Haidl G, Weidner W.* Epididymitis und Orchitis- klinisch- andrologische Implikationen. *Reproduktionsmedizin* 2002; 18(2): 61 – 65
- 31 *Haidl G.* Management strategies for male factor infertility. *Drugs* 2002; 62(12): 1741 – 1753
- 32 *Head JR, Billingham RE.* Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation* 1985; 40(3): 269 – 275
- 33 *Head JR, Neaves WB, Billingham RE.* Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival. *Transplantation* 1983; 36(4): 423 – 431
- 34 *Hedger MP.* Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev. Reprod.* 1997; 2(1): 38 – 47
- 35 *Hedger MP.* Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J. Reprod. Immunol.* 2002;(57): 19 – 34
- 36 *Hedger MP, Meinhardt A.* Local regulation of T cell numbers and lymphocyte-inhibiting activity in the interstitial tissue of the adult rat testis. *J. Reprod. Immunol.* 2000; 48(2): 69 – 80
- 37 *Hedger MP, Meinhardt A.* Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod. Immunol.* 2003; 58(1): 1 – 26
- 38 *Hedinger CE, Dhom G.* Spezielle pathologische Anatomie Pathologie des männlichen Genitale. Hoden - Prostata - Samenblasen: Springer-Verlag Berlin, 1991
- 39 *Henkel R, Maass G, Jung A, Haidl G, Schill W, Schuppe H.* Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl* 2007; 9(3): 299 – 304

- 40 *Hofmann N, Kuwert E.* Die chronische, nicht-erregerbedingte Orchitis. *Z. Hautkr.* 1979; 54(5): 173 – 180
- 41 *Holstein AF.* Spermatogenese beim Menschen: Grundlagen und Klinik. *Ann Anat* 1999;(181): 427 – 436
- 42 *Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff MS.* Myofibroblasts in the lamina propria of human semi-niferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch. Histol. Cytol.* 1996; 59(2): 109 – 125
- 43 *Hussein MR, Abou-Deif ES, Bedaiwy MA et al.* Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 2005; 83(5): 1447 – 1453
- 44 *Isaac JR, Skinner S, Elliot R et al.* Transplantation of neonatal porcine islets and sertoli cells into nonimmunosuppressed nonhuman primates. *Transplant. Proc.* 2005; 37(1): 487 – 488
- 45 *Jahnukainen K, Jørgensen N, Pöllänen P, Giwercman A, Skakkebaek NE.* Incidence of testicular mononuclear cell infiltrates in normal human males and in patients with germ cell neoplasia. *Int. J. Androl.* 1995; 18(6): 313 – 320
- 46 *Janeway CA TP.* Immunobiology. The immune system in health and disease. 6. ed. Aufl. New York: Garland Science [u.a.], 2005
- 47 *Jezek D, Banek L, Hittmair A, Pezerović-Panijan R, Goluza T, Schulze W.* Mast cells in testicular biopsies of infertile men with 'mixed atrophy' of seminiferous tubules. *Andrologia* 1999; 31(4): 203 – 210
- 48 *Kalaydjiev S, Dimitrova D, Nenova M, Peneva S, Dikov I, Nakov L.* Serum sperm antibodies are not elevated after mumps orchitis. *Fertil. Steril.* 2002; 77(1): 76 – 82
- 49 *Kliesch S.* Infertilität. In: Schmelz H, Sparwasser C, Weidner W (Hrsg). *Facharztwissen Urologie: Differenzierte Diagnostik Und Therapie: Springer-Verlag GmbH*, 2010: 787
- 50 *Köhn F, Schuppe H, Haidl G.* Andrologie. *Der Hautarzt* 2010; 61(9): 787 – 807
- 51 *Kopa Z, Wenzel J, Papp GK, Haidl G.* Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital tract inflammation. *Andrologia* 2005; 37(5): 188 – 194
- 52 *Krieger JN.* Epididymitis, orchitis, and related conditions. *Sex Transm Dis*; 11(3): 173 – 181
- 53 *Ludwig M.* Diagnosis and therapy of acute prostatitis, epididymitis and orchitis. *Andrologia* 2008; 40(2): 76 – 80

- 54 *Lui W, Mruk D, Lee WM, Cheng CY.* Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 2003; 68(4): 1087 – 1097
- 55 *Lumb RA, Bulleid NJ.* Is protein disulfide isomerase a redox-dependent molecular chaperone? *EMBO J.* 2002; 21(24): 6763 – 6770
- 56 *Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H et al.* Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J. Cell. Sci.* 2000; 113 (Pt 11): 2085 – 2090
- 57 *Maseki Y, Miyake K, Mitsuya H, Kitamura H, Yamada K.* Mastocytosis occurring in the testes from patients with idiopathic male infertility. *Fertil. Steril.* 1981; 36(6): 814 – 817
- 58 *Mazumdar S, Levine AS.* Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertil. Steril.* 1998; 70(5): 799 – 810
- 59 *Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H, Mayerhofer A.* Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil. Steril.* 2000; 74(2): 239 – 244
- 60 *Meinhardt A, Bacher M, Wennemuth G, Eickhoff R, Hedger M.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a paracrine mediator in the interaction of testicular somatic cells. *Andrologia* 2000; 32(1): 46 – 48
- 61 *Mikuz G, Damjanov I.* Inflammation of the testis, epididymis, peritesticular membranes, and scrotum. *Pathology annual* 1982; 17 (Pt 1): 101 – 128
- 62 *Mullaney BP, Skinner MK.* Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol. Endocrinol.* 1993; 7(1): 67 – 76
- 63 *Müller R, Klug J, Rodewald M, Meinhardt A.* Macrophage migration inhibitory factor suppresses transforming growth factor-beta2 secretion in cultured rat testicular peritubular cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 2005; 17(4): 435 – 438
- 64 *Nachtigall RD.* International disparities in access to infertility services. *Fertil Steril* 2006; 85(4): 871 – 875
- 65 *Nakane PK, Pierce GB.* Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell Biol.* 1967; 33(2): 307 – 318
- 66 *Nieschlag E.* *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes.* j3.Aufl. Berlin: Springer, 2009

- 67 *Nistal M, Santamaría L, Paniagua R.* Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat (Basel)* 1984; 119(3): 155 – 160
- 68 *Ohtani H, Wakui H, Ishino T, Komatsuda A, Miura AB.* An isoform of protein disulfide isomerase is expressed in the developing acrosome of spermatids during rat spermiogenesis and is transported into the nucleus of mature spermatids and epididymal spermatozoa. *Histochemistry* 1993; 100(6): 423 – 429
- 69 *Osegbe DN.* Testicular function after unilateral bacterial epididymo-orchitis. *Eur. Urol.* 1991; 19(3): 204 – 208
- 70 *Parvinen M, Söder O, Mali P, Fröysa B, Ritzén EM.* In vitro stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule segments by interleukin-1 alpha. *Endocrinology* 1991; 129(3): 1614 – 1620
- 71 *Pelletier RM, Byers SW.* The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc. Res. Tech.* 1992; 20(1): 3 – 33
- 72 *Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L et al.* TNFalpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(9): 4480 – 4488
- 73 *Petersen PM PBGA.* The human testis studied using stereological methods. *Acta stereologica* 15, p. 181- 185, 1996
- 74 *Pöllänen P, Niemi M.* Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int J Androl* 1987;(10): 37 – 42
- 75 *Poretsky L, Can S, Zumoff B.* Testicular dysfunction in human immunodeficiency virus-infected men. *Metab. Clin. Exp.* 1995; 44(7): 946 – 953
- 76 *Rival C, Guazzone VA, Wulffen W von et al.* Expression of co-stimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cells from normal and chronically inflamed rat testis. *Mol. Hum. Reprod.* 2007; 13(12): 853 – 861
- 77 *Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA.* WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male: Cambridge University Press, 2000
- 78 *Saari T, Jahnukainen K, Pöllänen P.* Autoantigenicity of the basal compartment of seminiferous tubules in the rat. *J. Reprod. Immunol.* 1996; 31(1-2): 65 – 79
- 79 *Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E.* Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur. J. Endocrinol.* 1997; 137(2): 107 – 117

- 80 *Schuppe H, Meinhardt A*. Immune privilege and inflammation of the testis. *Chemical immunology and allergy* 2005; 88: 1 – 14
- 81 *Schuppe H, Meinhardt A, Allam JP, Bergmann M, Weidner W, Haidl G*. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia* 2008; 40(2): 84 – 91
- 82 *Schuppe H, Pilatz A, Hossain H et al*. Orchitis und Infertilität. *Urologe A* 2010; 49(5): 629 – 635
- 83 *Schuppe H-C, Fijak M, Haidl G, Meinhardt A*. Immunology and immunopathology of the testis. In: *Biology of the male germ cell*. Glander H, Grunewald S, Paasch U. (eds). Aachen: Shaker Verlag GmbH, 2008
- 84 *Schuppe HC, Neumann NJ, Scheffzyk A, Schock-Skasa G, Hofmann N, Schill WB*. Inflammatory reactions in testicular biopsies in infertile men. *Andrologia* 2001;(33): 327 – 328
- 85 *Siu MKY, Cheng CY*. Interactions of proteases, protease inhibitors, and the beta1 integrin/laminin gamma3 protein complex in the regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis. *Biol. Reprod.* 2004; 70(4): 945 – 964
- 86 *Suescun MO, Rival C, Theas MS, Calandra RS, Lustig L*. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol. Reprod.* 2003; 68(6): 2114 – 2121
- 87 *Suominen J, Söderström KO*. Lymphocyte infiltration in human testicular biopsies. *Int. J. Androl.* 1982; 5(5): 461 – 466
- 88 *Tung KS, Teuscher C*. Mechanisms of autoimmune disease in the testis and ovary. *Hum. Reprod. Update* 1995; 1(1): 35 – 50
- 89 *Urade R, Nasu M, Moriyama T, Wada K, Kito M*. Protein degradation by the phosphoinositide-specific phospholipase C-alpha family from rat liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(21): 15152 – 15159
- 90 *Wang J, Wreford NG, Lan HY, Atkins R, Hedger MP*. Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biol. Reprod.* 1994; 51(3): 551 – 561
- 91 *Weidner W, Garbe C, Weißbach L et al*. Initiale Therapie der akuten einseitigen Epididymitis mit Ofloxacin. *Andrologische Befunde. Urologe A* 29:277-280, 1990
- 92 *Weidner W, Krause W, Ludwig M*. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum. Reprod. Update* 1999; 5(5): 421 – 432

- 93 *Witkin SS, Chaudhry A.* Relationship between circulating antisperm antibodies in women and autoantibodies on the ejaculated sperm of their partners. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989; 161(4): 900 – 903
- 94 *Xu D, Perez RE, Rezaiekhalth MH, Bourdi M, Truog WE.* Knockdown of ERp57 increases BiP/GRP78 induction and protects against hyperoxia and tunicamycin-induced apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2009; 297(1): L44-51
- 95 *Yakirevich E, Yanai O, Sova Y et al.* Cytotoxic phenotype of intra-epithelial lymphocytes in normal and cryptorchid human testicular excurrent ducts. *Hum. Reprod.* 2002; 17(2): 275 – 283
- 96 *Yule TD, Montoya GD, Russell LD, Williams TM, Tung KS.* Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. *J. Immunol.* 1988; 141(4): 1161 – 1167
- 97 *Yule TD, Tung KS.* Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor. *Endocrinology* 1993; 133(3): 1098 – 1107
- 98 *Zengwhei Y, Wreford NG, Royce P.* Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;(83:): 1284 – 1291
- 99 *Zettl UK.* *Klinische Neuroimmunologie. Aktuelle Aspekte* Berlin: de Gruyter, 1999: 45-47

8 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen sehr herzlich danken, durch deren Begleitung und Hilfe diese Arbeit ermöglicht wurde.

Herrn Professor Dr. med. H.C. Schuppe möchte ich ganz besonders für die Überlassung des Themas und die vielfältige Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation sowie für die intensive Betreuung danken.

Frau Dr. M. Fijak danke ich vielmals für ihre ständige Hilfsbereitschaft, die intensive Unterstützung und das mir so oft entgegen gebrachte Verständnis während der Arbeit im Labor und auch bei der Erstellung der Dissertation.

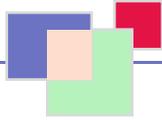
Weiterhin geht ein besonderer Dank an das gesamte Team der Arbeitsgruppe „Reproduktionsbiologie“ von Prof. Dr. Meinhardt für die Betreuung, Hilfestellung und Überlassung der Räumlichkeiten zur Durchführung meiner Experimente.

Prof. Dr. Haidl und seinem Team danke ich vielmals für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung von Proben und Daten.

Ein großer Dank geht ebenfalls an das Team der Klinik für Transfusionsmedizin für das Sammeln und zur Verfügung stellen der Serumproben.

Ich bedanke mich vielmals bei Dr. Pilatz für die Bereitstellung von Proben und zugehörigen Daten der urologischen Patienten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und Moritz für die langjährige Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis während der Anfertigung meiner Dissertation ganz herzlich danken.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5959-0



9 783835 959590