

**Einfluss von Angiotensin II auf die Motilität humaner Spermatozoen
und Charakterisierung beteiligter Rezeptoren**

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

vorgelegt von
Enrique Alejandro Lafont
aus Gießen

Gießen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
-Hautklinik-
Abteilung Allgemeine Dermatologie und Andrologie
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. P. Mayser
des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Giessen

Betreuer: Professor Dr. Dr. habil. W.-B. Schill
Dr. C. Müller

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Gutachter: | Professor Dr. Dr. habil. W.-B. Schill |
| Gutachter: | PD Dr. E. Hauck |
| Vorsitzender der Prüfungskommission: | Professor Dr. Gallhofer |
| Prüfungsmitglied: | Professor Dr. Schachenmayr |

Tag der Disputation: 29. Mai 2006

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche 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 Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Folgende Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Abstracts

1. Müller C, Alexandre-Lafont E, Schill W-B, Köhn F-M (2001). Einfluss des Renin-Angiotensin-Systems auf humane Spermatozoen. 2. Kolloquium: „Junge, forschende Reproduktionsmediziner“, 4.-6.5.2001, Freiburg (Vortrag) IVF-News 2001; 4: 85
2. Alexandre-Lafont E, Köhn FM, Schill W-B, Müller C (2001). Influence of angiotensins on human sperm motility. J Androl (Supplement 5/6 2001):124 7th International Congress of Andrology, Montreal., Canada, June 15-19, 001
3. Müller C, Alexandre-Lafont E, Köhn F-M, Schill W-B (2001). Angiotensins influence human sperm motility via membrane receptors. Hum Rep 16: 28 17th Annual ESHRE Meeting, 01.-04. Juli, Lausanne, Schweiz (2001).
4. Müller C, Alexandre-Lafont E, Becker M, Siems W, Schill W-B, Köhn F-M (2001) The enzymatic degradation of angiotensin I (AI) in human semen. Deutsche Gesellschaft für Andrologie (DGA), 07.-08.09.2001, Berlin
5. Müller C, Alexandre-Lafont E, Schill W-B, Köhn F-M (2001). Angiotensin II receptors on human spermatozoa. 57th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM), 20.-25.10.2001, Orlando Fertility and Sterility, Suppl. 1, 76, No. 3: 98
6. Alexandre-Lafont E, Köhn FM, Schill WB, Müller C (2001). The renin-angiotensin-system and human spermatozoa. Deutsche Gesellschaft für Andrologie, Gießen, 17.11.2001
7. Müller C, Alexandre-Lafont E, Becker M, Siems WE, Schill WB, Köhn FM (2002). Enzymatic degradation of human seminal angiotensin I (AI) ESHRE 2002, Wien

Publikationen

1. Müller C, Alexandre-Lafont E, Schill W-B, Köhn FM. Angiotensin receptors on human spermatozoa. (in Vorbereitung)
2. Müller C, Alexandre-Lafont E, Schill W-B, Köhn FM. Angiotensins modulate sperm motility (in Vorbereitung)

Poster

1. Influence of angiotensins on human sperm motility. Alexandre-Lafont., E., Müller, C., Köhn, F.-M., Schill, W.-B. VIIth International Congress of Andrology, june 15-19, 2001, Montreal, Canada
2. The enzymatic degradation of angiotensin I (AI) in human semen. Müller C., Alexandre-Lafont E., Becker M., Siems W-E., Schill W-B., Köhn F-M. 13th Annual Meeting of the German Society of Andrology. September 6-9, 2001, Berlin, Germany.

*Für meinen Sohn
Elias
in Liebe gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 9 |
| 1. 2. Aufbau und Funktion menschlicher Spermatozoen | 12 |
| 1. 3. Spermatozoenreifung und Eizellinteraktion | 16 |
| 1. 3. 1. Kapazitation | 17 |
| 1. 3. 2. Akrosomale Reaktion | 18 |
| 1. 3. 3. Zona pellucida-Interaktion und Polyspermieblock | 19 |
| 1. 3. 4. Akrosin | 20 |
| 1. 4. Pharmakologie des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) | 21 |
| 1. 4. 1. Physiologie des RAS | 21 |
| 1. 4. 1. 1. Renin | 23 |
| 1. 4. 1. 3. AII-Rezeptoren (AT) | 25 |
| 1. 4. 1. 3. 1. AII-Rezeptor Typ 1 (AT1) | 26 |
| 1. 4. 1. 4. 2. AII- Rezeptor Typ 2 (AT2) | 27 |
| 1. 4. 2. Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer) | 29 |
| 1. 4. 3. AII-Rezeptor-Antagonisten (AT-Antagonisten) | 30 |
| 2. Ziel der Arbeit | 32 |
| 3. Material und Methoden | 34 |
| 3. 1. Herstellung der Inkubationsmedien | 34 |
| 3. 2. Auswahl der Spender | 34 |
| 3. 3. Qualitätsansprüche an die Ejakulate | 35 |
| 3. 4. Gewinnung des Untersuchungsmaterials | 35 |
| 3. 5. Glaswollfiltration | 36 |
| 3. 6. Isolierung der Spermatozoen aus dem Seminalplasma | 36 |
| 3. 7. Immunoblot (Western-Blot) an humanen Spermatozoen zum Nachweis von AT1 und AT2 | 37 |
| 3. 7. 1. Aufbereitung der Proben für die Gelelektrophorese | 37 |
| 3. 7. 2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) | 38 |
| 3. 7. 3. Immunoblot | 39 |
| 3. 7. 3. 1. Westernblot | 40 |
| 3. 7. 3. 2. Elektrotransfer | 40 |
| 3. 7. 3. 3. Immunbiochemische Proteinidentifizierung | 41 |
| 3. 8. Immunzytochemie an humanen Spermatozoen | 41 |
| 3. 8. 1. Anfertigung der Spermatozoenausstriche | 42 |
| 3. 8. 2. Durchführung der Immunzytochemie | 43 |
| 3. 8. 2. 1. Zweifachmarkierung mit einem Antikörper und einem DNA-Farbstoff (DAPI) | 44 |
| 3. 8. 2. 2. Dreifachmarkierung mit einem Rezeptorantikörper, PSA-FITC und DAPI | 45 |
| 3. 8. 2. 3. Dreifachmarkierung mit zwei verschiedenen, gegen unterschiedliche Zielproteine, gerichtete Antikörper und DAPI | 45 |
| 3. 8. 2. 4. Immunzytochemie nach Kapazitation | 45 |
| 3. 9. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbend Essay) | 47 |
| 3. 9. 1. Prinzip des ELISA | 47 |
| 3. 9. 1. 1. Einführung | 47 |
| 3. 9. 1. 2. Methode | 47 |
| 3. 10. Motilitätsbestimmung mittels Computergestützter Analysis (CASA) | 52 |
| 3. 10. 1 Einführung | 52 |
| 3. 10. 2. Motilitätsmessungen an humanen Spermatozoen mittels CASA | 54 |
| 3. 10. 2. 1. Einfluss von AII auf die Bewegung humaner Spermatozoen | 55 |
| 3. 10. 2. 2. Losartan [®] , Saralasin, PD123319 | 58 |

| | |
|--|------------|
| 3. 11. Statistische Auswertung..... | 59 |
| <u>4. Ergebnisse</u> | 60 |
| 4. 1. Immuncytochemische Lokalisation von AII- Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 auf humanen Spermatozoen.. | 60 |
| 4. 1. 1. Nachweis von AT1 auf humanen Spermatozoen..... | 60 |
| 4. 1. 2. Nachweis von AT2 auf humanen Spermatozoen..... | 62 |
| 4. 1. 3. Immuncytochemischer Nachweis des AT2 in Abhängigkeit von der Akrosomalen Reaktion..... | 63 |
| 4. 2. Immunoblot | 65 |
| 4. 2. 1. Angiotensin II Rezeptor Typ1 (AT1) | 65 |
| 4. 2. 2. Angiotensin II Rezeptor Typ 2 | 66 |
| 4. 3. ELISA | 67 |
| 4. 4. CASA..... | 71 |
| 4. 4. 1. Einfluss von AII (AII) auf Motilitätsparameter humaner Spermatozoen | 74 |
| 4. 4. 3. Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die Wirkung von AII (AII)..... | 81 |
| <u>5. Diskussion</u> | 95 |
| 5. 1. Einleitung | 95 |
| 5. 1. 1. Überblick bisheriger Forschungsergebnisse über das RAS im männlichen Reproduktionstrakt.... | 96 |
| 5. 1. 2. Relevanz von ACE für die Spermatozoenfunktion..... | 100 |
| 5. 2. Diskussion der Ergebnisse | 104 |
| 5. 2. 1. AII in humanem Seminalplasma | 104 |
| 5. 2. 1. 1. Eigene Ergebnisse..... | 104 |
| 5. 2. 1. 2. Literatur | 105 |
| 5. 2. 1. 3. Vergleich und Diskussion der Ergebnisse | 107 |
| 5. 2. 1. 4. Bewertung..... | 110 |
| 5. 2. 2. AII-Rezeptoren auf humanen Spermatozoen..... | 113 |
| 5. 2. 2. 1. Eigene Ergebnisse..... | 113 |
| 5. 2. 2. 2. Literatur | 115 |
| 5. 2. 2. 3. Vergleich und Diskussion der Ergebnisse | 118 |
| 5. 2. 2. 4. Bewertung..... | 121 |
| 5. 2. 3. Einfluss von AII auf die Motilität humaner Spermatozoen | 122 |
| 5. 2. 3. 1. Eigene Ergebnisse..... | 122 |
| 5. 2. 3. 2. Literatur | 127 |
| 5. 2. 3. 3. Vergleich und Diskussion der Ergebnisse | 128 |
| 5. 2. 3. 4. Bewertung..... | 132 |
| 5. 3. Schlussfolgerung und abschließende Bewertung | 134 |
| <u>6. Zusammenfassung</u> | 138 |
| 6. 1. Deutsch..... | 138 |
| 6. 2. Englisch..... | 141 |
| <u>7. Herstellerliste und eingesetzte Materialien</u> | 145 |
| <u>8. Literatur</u> | 147 |
| <u>10. Danksagung</u> | 169 |
| <u>11. Abkürzungsverzeichnis</u> | 170 |
| <u>11. Curriculum vitae</u> | 171 |

1. Einleitung

Mehr als 15 % aller Paare in Deutschland sind zeitweise oder dauerhaft ungewollt kinderlos (*Bruckert, 1991*). Der andrologische Faktor spielt als Ursache für die Kinderlosigkeit eine wesentliche Rolle. Er ist in 50% der Fälle entscheidend, wobei 30 % der betroffenen Männer kein morphologisches Äquivalent ihrer Fertilitätsstörung aufweisen und somit als "idiopatisch steril" klassifiziert werden. Die wesentlichen Therapieoptionen sind in diesen Fällen die Methoden der assistierten Reproduktion. Hierbei sind heutzutage, neben der intrauterinen Insemination (IUI) und der klassischen In-vitro-Fertilisation (IVF), die intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) und, bei Fehlen von Spermatozoen im Ejakulat, die testikuläre Spermienextraktion (TESE) die erfolgversprechendsten Methoden.

Enorme Fortschritte in der Gentechnik wirken sich auf die Reproduktion aus, in dem sich die Nachfrage nach „Designerbabys“ und der Veränderung einzelner Merkmale im Erbgut häufiger stellt und die Möglichkeiten und Ergebnisse, die Menschen über Presse und Fernsehen erreichen.

Die ersten Versuche der assistierten Reproduktion beim Menschen, die intrauterine Insemination (IUI), gehen vermutlich auf *John Hunter* am Ende des 18. Jahrhunderts zurück (*Toellner et al., 1994*). Für erfolgreiche Versuche am Menschen gibt es erst 1861 sichere Hinweise, als in der Zeitschrift „*l'Âbeille medicale*“ zehn Beobachtungen einer Schwangerschaft, nach von *Dr. Girault* durchgeführten intrauterinen Inseminationen beschrieben werden. Die früheste soll aus dem Jahr 1838 stammen. Hingegen wird der erste Fall humaner intrauteriner Insemination mit Spermia eines Spenders *R.-L. Dickinson* (1890) zugeschrieben (*Toellner et al., 1994*). Eine diesbezügliche bis heute gültige Grundregel geht auf *Pajot* (1877) zurück: „*Dieses Vorgehen (IUI) ist nur ein letzter Ausweg, wenn Ursachen für heilbare Sterilität methodisch bei beiden Partnern behandelt worden sind.*“ (*Toellner, 1990*).

Die erste Befruchtung menschlicher Eizellen im Reagenzglas geht auf *John Rock* und *M. F. Menkin*, die diese Versuche 1944 in den USA durchführten, zurück (*Hertig et al. 1956*). 1957 gelang *Min Cheun Chang* die erste In-vitro-Fertilisation an Säugetieren (Kaninchen), aus denen lebende Nachkommen hervorgingen. Den Engländern *Patrick Steptoe* und *Robert Edwards* gelang 1977 die erste erfolgreiche In-vitro-Fertilisation am Menschen. Das erste außerhalb des Körpers gezeugte Kind, das erste „Retortenbaby“ also, ist *Louise Brown*, die am 25. Juli 1978 in England geboren wurde (*Steptoe & Edwards 1980*).

1992 wurde erstmalig erfolgreich ein Spermatozoon direkt in die Eizelle injiziert (Intrazytoplasmatische Spermatozoen Injektion: ICSI) (*Palermo et al. 1992*). Mit der ICSI

werden somit sämtliche physiologische Barrieren für den Eintritt des Spermatozoons in die Eizelle umgangen.

Untersuchungen belegen, dass die Motilität humaner Spermatozoen ein wesentlicher Faktor für eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle bei den Methoden der assistierten Reproduktion ist (*Mahadevan und Trounson, 1984; Bongso et al., 1989; Tucker et al., 1991; Hinney et al., 1993; Morales et al., 1993*). Die Motilität konnte diesbezüglich positiv mit der Schwangerschaftsrate nach IVF und der Penetrationsfähigkeit beim Hamster-Oozyten-Penetrations-Test (HOP) korreliert werden (*Holt et al., 1985*).

Die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft beim Menschen auf physiologischem Wege hängt ebenfalls signifikant von der Motilität der Spermatozoen ab (*Larsen et al., 2000*). Die Geschwindigkeit der Spermatozoen ($\mu\text{m/s}$) als Parameter der Spermatozoenfunktion korreliert dabei positiv mit der Fertilisierungsrate (*Holt et al., 1985, Hinting et al., 1988, Grunert et al., 1989, Bongso et al., 1989, Vantman et al., 1989, Barlow et al., 1991*). Die Erklärung ist vermutlich, dass eine höhere Motilität (Anteil motiler Spermatozoen in %) die Anzahl Spermatozoen, die in vivo die Eizelle erreichen und mit dieser interagieren können, erhöht (*Morales et al., 1993*).

Die Motilität humaner Spermatozoen ist somit ein essentieller Faktor für die Reproduktion sowohl auf natürlichem Wege, wie in den Methoden der assistierten Reproduktion. Sie lässt sich pharmakologisch beeinflussen. Verschiedene Substanzen wurden ausfindig gemacht, die die Motilität erhöhen können. Unter den motilitätsfördernden Substanzen sind die Kinine Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen (*Sato, 1980; Kaneko & Moriwaki, 1981; Miska & Schill 1990, 1994; Müller et al., 1990; Schill & Miska, 1992; Somlev & Helili, 1996*). Andere Substanzen, wie beispielsweise das Methylxanthinderivat Pentoxifyllin, ein Phosphodiesterase-hemmer, weisen ebenfalls eine signifikante motilitätssteigernde Wirkung auf (*Hellström und Sikka, 1989; Hammitt et al., 1989; Köhn et al., 1993; Airbarg et al., 1994; Stanic, 2002*). Auch die Konzentration der, in der Steroidsynthese wichtigen, Aromatase, die in humanen Spermatozoen nachgewiesen werden kann, korreliert positiv mit der Motilität humaner Spermatozoen (*Lambard et al., 2003*).

Ein weiteres System, das Einfluss auf die Spermatozoenmotilität und Funktion hat, ist das Renin-Angiotensin-System. Es ist im männlichen Reproduktionstrakt nachweisbar und verschiedene Untersuchungen belegen, dass Angiotensin II (AII) die Motilitätsparameter humaner Spermatozoen positiv beeinflussen kann sowie an der Modulierung der akrosomalen Reaktion (AR) beteiligt ist (*Sato, 1980; Kaneko & Moriwaki, 1981; Hellström und Sikka, 1989; Hammitt et al., 1989; Miska & Schill 1990; Schill & Miska; Müller et al., 1990, 1992;*

Köhn et al., 1993; Airbarg et al., 1994; Vinson et al., 1995, Somlev & Helili, 1996; Vinson et al., 1996, 1997; Stanic, 2002; siehe auch Tabelle 20, Kapitel 5).

Die beteiligten Peptide, ihre Rezeptoren und ihre pharmakologischen Antagonisten sind auf Grund der aktuell enormen Bedeutung für die Therapie der Hypertonie, des stattgehabten Myokardinfarktes und der Herzinsuffizienz gut untersucht (CONSENSUS-Studie 1987, SOLVD-Studie; 1991 und 1992, SAVE-Studie, 1992, ELITE-II-Studie, 1999).

Das RAS bietet darüber hinaus die Möglichkeit therapeutischer Ansätze in den Methoden der assistierten Reproduktion aufgrund seiner Lokalisation im humanen weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt. AII ist ein physiologisch im humanen Ejakulat vorhandenes Peptid, das seine Effekte in physiologischer Konzentration bewirkt. Versuche in der Reproduktionsmedizin sind somit bezüglich einer eventuellen Teratogenität oder Toxizität unbedenklich.

Es können Effekte beobachtet werden, die man sich in den Methoden der assistierten Reproduktion zu Nutze machen könnte. Einige Ergebnisse der verschiedenen Studien sind jedoch unvollständig oder widersprüchlich. Voraussetzung für eine klinische Erprobung ist daher ein fundiertes Grundlagenwissen, was die Untersuchung der Wirkung der Peptide, beteiligter Rezeptoren und gängiger Pharmaka *in vitro* voraussetzt. Die lückenhaften Erkenntnisse müssen komplettiert werden und widersprüchliche Ergebnisse abgeklärt werden. Dies ist eine Voraussetzung für eine Erprobung im Tierversuch und vielleicht eines Tages als medikamentöser Zusatz in den Methoden der assistierten Reproduktion.

1. 2. Aufbau und Funktion menschlicher Spermatozoen

Spermatozoen sind DNA-Vektoren, ihr Aufbau ist artspezifisch (Abb. 1-3). Reife Spermatozoen entstehen im Keimepithel des Hodens. *Lichtmikroskopisch* (Abb. 1 und 2) ergibt sich lediglich die grobe Unterteilung in Spermatozonenkopf und Flagellum (= Geißel).

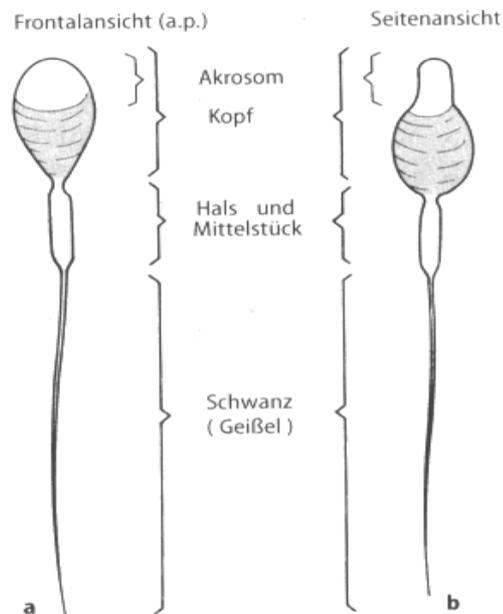


Abb. 1: Lichtmikroskopischer Aufbau eines humanen Spermatozoons, grafische Rekonstruktion (Ludwig et al. 1996).

Das Flagellum gliedert sich in vier Anteile: Das *Halsstück*, das meist durch einen Zytoplasmotropfen verdeckt wird, stellt Reste des Endoplasmatischen Retikulums dar. Ihm folgt *Mittel-*, *Haupt-* und *Endstück*, welche der Fortbewegung dienen.



Abb. 2: Reifes Spermatozoon: Ovaler Kopf, Hals-, Mittelstück, gestreckte Geißel. Papanicolaoufärbung, Vergrößerung x 640 (Ludwig et al. 1996)

Elektronenmikroskopisch können den genannten Abschnitten detailliertere Informationen entnommen werden (Abb. 3). In der Aufsicht erscheint der ca. 4µm lange und ca. 2 µm dicke **Kopf** tennisschlägerförmig, seitlich betrachtet läuft er zur Spitze hin birnenförmig aus. Dieser enthält den Kern und darin die *DNA*. Der Kern beinhaltet dicht gepacktes *Karyoplasma*, in dem sich regelmäßig Vakuolen identifizieren lassen. Dem Kopf sitzt kappenförmig das **Akrosom** (griech. *Akron*: die Spitze, der Gipfel; *soma* der Körper) auf. Es entwickelt sich aus dem Golgiapparat der Spermatische (*Leblond & Clermont, 1952; Fawcett 1975; Bellve & O'Brien, 1983*). Es stellt somit ein modifiziertes Lysosom dar, welches eine Reihe hydrolytischer Enzyme beinhaltet. Die wichtigsten sind Hyaluronidase und **Akrosin**. Letztere ist eine trypsinähnliche Proteinase, die die Penetration der Zona pellucida als Schlüsselenzym ermöglichen soll.

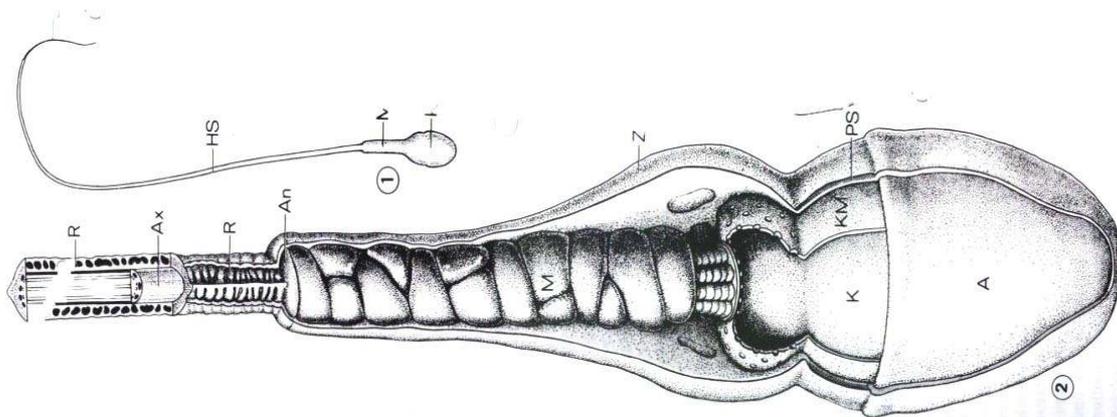


Abb. 3: Grafische Rekonstruktion elektronenmikroskopischer Befunde. K: Kopf, MS: Mittelstück, HS: Hauptstück, ES: Endstück. Vergr.: 1800fach; A: Akrosom, K: Kern, KM: Kernmembran, PS: Postakrosomale Scheide, Z: Zytoplasmotropfen, M: Mitochondrium, An: Anulus, R: Ringfaser, Ax: Axonema. Vergr.: x 21000 (*Holstein et al. 1981*).

Die Hyaluronidase soll die Penetration des Cumulus oophorus erleichtern (*Schill, 1975; Schill et al., 1988*). Saure Phosphatase lässt sich als weiteres Enzym in einer Konzentration von 100-300µg/ml nachweisen. Der **Aufbau des Akrosoms** gliedert sich in eine „äußere akrosomale Membran“, die sich unter der Plasmamembran befindet, der Matrix und der „inneren akrosomalen Membran“, die der Kernmembran aufliegt. Die zentrale Bedeutung des Akrosoms liegt in der akrosomalen Reaktion, Zonabindung und Zonapenetration. Unter „**akrosomaler Reaktion**“ subsumiert man die Freisetzung der Stoffe, die zur Penetration der Eihüllen notwendig sind. Dies erfolgt physiologischer Weise bei Kontakt des Spermatozoons mit der Eizelle. Die Zellmembran im hinteren Anteil weist einen besonderen Aufbau auf und wird postakrosomale Scheide genannt. Der Übergang zum Flagellum erfolgt über die so

genannte *Basalplatte*, direkt im Anschluss an den Kern. In dieser Region ist die Kernmembran häufig abgelöst vom Karyoplasma und mit vielen Poren versehen. Das **Flagellum** ist insgesamt 50 – 60µm lang und wird in vier Teilbereiche untergliedert: Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück, es ist ca. zehnmals länger als der Kopf (*Cummins & Woodall, 1985*). Das Halsstück enthält den so genannten Streifenkörper, welcher aus dem ursprünglichen kernnahen Zentriol entsteht. In T-Stellung schließt sich das Axonema an, welches ebenfalls aus dem kernnahen Zentriol hervorgeht (das distale Zentriol ist beim reifen Spermatozoon nicht mehr erkennbar). Das Axonema weist den ziliotypischen Aufbau aus zwei zentralen Einzel- und neun peripheren Doppeltubuli auf, welche durch Dyneinarme verbunden sind (klassisches 9 + 2 – Muster). Dieser Aufbau ist enorm wichtig für die Fortbewegung, bei Fehlen der Dyneinarme resultieren immotile Spermatozoen (*Afzelius et al., 1975*). Im 3,5 – 5 µm langen Mittelstück wird das Axonema helikal (ca. 10 – 15 Windungen) von Mitochondrien umgeben, welche als Gesamtheit das eigentliche „Antriebsaggregat“ der Spermatozoen darstellen. Sie sind für die Energiegewinnung zuständig (*Van Deurs & Lastein, 1973*). Das Mittelstück schließt mit dem so genannten Anulus ab, einer ringförmigen, elektronendichten Struktur. Die folgenden 40 – 50 µm werden als Hauptstück bezeichnet, der Durchmesser nimmt nach distal hin ab (0,5 → 0,4 µm). Es enthält weiterhin das Axonema, Längsfasern, die eine Schienung bewirken und somit den Bewegungsumfang begrenzen und Ringfasern, letztere durch seitliche „Leisten“ gesichert. Es handelt sich hierbei um die so genannten Mantelfasern, nicht kontraktile, passiv elastische Elemente (*Baccetti et al., 1973; Swan et al., 1980; Henkel et al., 1992; Stalf et al., 1993*). Sie sind für die Progressivmotilität mitverantwortlich, in dem sie den Ausschlag des Flagellums begrenzen und federnd Energie in Bewegung umwandeln. Den Abschluss macht sinngemäß das Endstück. Mit 4 – 6 µm ist es relativ kurz und nur 0,2 µm dick. Seine Besonderheiten sind das Fehlen von Ringfasern und das Fehlen der klassischen 9+2 Anordnung der Tubuli. Diese sind hier nur noch als vereinzelte Tubuli vorhanden. Die Funktionen vieler dieser Strukturen sind unklar. Als gesichert gilt die Bedeutung von Akrosin, neben anderen Enzymen, bei der Penetration des Spermatozoons in die Eizelle (siehe Kapitel 1.3). Ebenfalls an der Kontaktaufnahme mit der Eizelle beteiligt ist das äquatoriale Segment des Akrosoms. Die Steuerung der Bewegung erfolgt im Halsstück, im Mittelstück sind die Mitochondrien für den Energiestoffwechsel zuständig. Die beschriebene Architektur des Flagellums ermöglicht die Fortbewegung der Spermatozoen durch ein kompliziertes Ineinandergreifen der aktiven und passiven Elemente. Die Bewegung des Flagellums ist „schrauben- und wellenförmig“. In Tabelle 1 folgt eine Zusammenfassung von Aufbau und Bedeutung der wichtigsten Strukturen menschlicher Spermatozoen.

| <u>STRUKTUR</u> | <u>Beschreibung</u> |
|---|--|
| <u>Spermatozoenkopf</u> | = Kern + Akrosom + postakrosomale Region |
| - Form: Aufsicht Seitenansicht | - „Tennisschläger“ - „birnenförmige“ Verjüngung zur Spitze hin |
| - Länge | - 3,4 – 4,6 μm |
| - Dicke | - 1,5 – 2,8 μm |
| - Wichtige Strukturen - Kern - Akrosom - Postakrosomale Region | - stark verdichtetes Karyoplasma (enthält die DNA) mit vereinzelt Vakuolen - „mützenartig“ dem Kopf aufsitzend; geht aus dem Golgiapparat hervor - enthält verschiedene Enzyme, u. a. Akrosin - eingehüllt von „postakrosomaler Scheide“, einer spezialisierten Zellmembran |
| <u>Konnektion</u> | Das Flagellum ist über eine Basalplatte am Kern implantiert. In diesem Bereich erscheint die Kernmembran häufig abgelöst vom Karyoplasma und mit zahlreichen Kernporen versehen. |
| <u>Flagellum</u> | = Hals- + Mittel- + Haupt- + Endstück |
| - Halsstück | - <u>Streifenkörper</u> : enthält das ursprünglich kernnahe Zentriol - <u>Axonema</u> : In T-Stellung zum Streifenkörper, aus dem kernnahen Zentriol hervorgegangen (distales Zentriol nicht mehr erkennbar). - <u>Aufbau</u> : 2 zentrale Einzel- und 9 periphere Doppeltubuli (klassisches 9 + 2 –Muster, Tubulus-Gleitmodell) |
| - Mittelstück | 3,5 – 5 μm lang, 0,8 μm breit; Axonema wird von Mitochondrien helikal (ca. 10 – 15 Windungen) umgeben; Abschluss mit dem so genannten Anulus: ringförmige elektronendichte Struktur |
| - Hauptstück | 44 – 50 μm lang, Durchmesser nimmt nach distal ab (0,5 -> 0,2 μm) Bestandteile: Axonema, Längsfasern und Ringfasern, letztere durch seitliche „Leisten“ gesichert |
| - Endstück | 4 – 6 μm lang, 0,2 μm dick, keine Ringfasern, Tubuli nicht mehr in 9+2 Anordnung, nur noch als vereinzelt Tubuli |

Tabelle 1: Charakteristika humaner Spermatozoen

1. 3. Spermatozoenreifung und Eizellinteraktion

Die Fertilisation ist ein komplexer, multifaktorieller Prozess, bei dem Eizelle, Spermatozoon und umgebendes Milieu einander angepasst sein müssen. Der Ausfall eines einzigen wichtigen Faktors in diesem Prozess kann Infertilität zur Folge haben. Männliche Sterilität wird von Mangel an Quantität und/oder Qualität der Spermatozoen bestimmt. Die Spermatogenese ist hierbei das kritische Ereignis. Weitere Einflüsse sind Alter, Umweltfaktoren und Gesundheitszustand. Die Eizelle muss einen gewissen Reifegrad erreichen, um befruchtet werden zu können. Hierbei muss neben der Reife des Ooplasten (Trounson & Webb, 1984), auch die Zona pellucida (Tsesarik & Kopecny, 1986) gereift sein. Die Zona pellucida muss dabei die Fähigkeit zur Spermatozoenbindung aufweisen (Franken et al., 1991a, 1993; Bedford & Kim, 1991; Oehninger et al., 1991). Das Spermatozoon muss die Fähigkeit haben, die Eizelle zu erreichen und in die Eizelle einzudringen.

Die Entwicklung eines reifen, humanen Spermatozoons benötigt einen Zeitraum von ca. 82 Tagen, danach ist es allerdings noch weitgehend unbeweglich (Heller, C. G. & Y. Clermont, 1964). Peristaltische Bewegungen, befördern die unreifen Spermatiden nach ca. 70 Tagen Entwicklung in das Rete testis, von wo aus diese in ca. 12 Tagen in den Nebenhodenschweif gelangen, wo sie gespeichert werden. Das fertige Ejakulat enthält zu über 90% Bestandteile aus Prostata, Bläschen- und weiteren kleinen Drüsen entlang der Harnsamenröhre, die unter anderem die Beweglichkeit reifer Spermatozoen induzieren.

Spermatozoen sind nach ihrem Austritt aus den Tubuli seminiferi zunächst unreif. Der Prozess den sie durchlaufen, um befruchtungsfähig zu werden, wird als epididymale Reifungsphase bezeichnet (Hinrichsen-Kohane et al., 1984). Die epididymale Reifungsphase vermittelt die Fähigkeit zur progressiven Fortbewegung der Spermatozoen (Fawcett, 1975; Eddy und O'Brien, 1994). Die Aktivität der Adenylatcyclase und cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration im Spermatozoon korrelieren positiv mit der Spermatozoenmotilität (Ishikawa et al., 1989). Hierbei ist der Energielieferant Adenosintriphosphat (ATP), welches die Energie für die Dyneinarme bereitstellt (Fawcett, 1975; Eddy und O'Brien, 1994). Dies erfolgt über eine Spaltung des ATP durch die Adenylatcyclase, wobei cAMP entsteht.

Das Spermatozoon weist die höchste Bindungskapazität für cAMP im Flagellum auf (Eddy und O'Brien, 1994). Die Inaktivierung erfolgt, wie in anderen Geweben auch, über Phosphodiesterasen (Eddy und O'Brien, 1994, Fisch et al., 1999). Die Eigenbeweglichkeit der Spermatozoen wird in der Cauda epididymis induziert (Austin, 1985). Dies geschieht durch Kontakt der reifen Spermatozoen mit Komponenten des Seminalplasmas, hauptsächlich aus Prostata und Vesicula seminalis (Cooper, 1986). Neben der Induktion der Beweglichkeit, hat

der Kontakt mit dem Seminalplasma zur Folge, dass die männlichen Gameten mit so genannten Dekapazitationsfaktoren („sperm-coat-antigenes“) überzogen werden. Diese stabilisieren das Akrosom wodurch die Spermatozoen zeitweilig nicht befruchtungsfähig sind (*Oliphant et al., 1985*). Während des Kapazitationsvorganges, des abschließenden Reifungsprozesses (siehe unten), werden diese Faktoren entfernt, es findet weiterhin eine Modifikation der Spermatozoen- und Akrosomalmembran statt (*Yanagimachi, 1981*).

1. 3. 1. Kapazitation

Nach der Emissio des Ejakulates in die Vagina und des Eintrittes der Spermatozoen in den Zervikalkanals erfolgt der Transport in die Tuben weitgehend passiv (*Croxatto et al., 1978*). Der Weg zur Eizelle weist physiologische Hindernisse auf (Cervix-Mucus-Barriere, Gegenstrom der Oviductflüssigkeit, Enge des Tubenwinkels, u.a.). An der Eizelle angelangt erfolgt zunächst die Kumulus-Passage, deren Voraussetzung ein Reifungsprozess der Spermatozoen ist (*Corselli & Talbot, 1987, Cummins & Yanagimachi, 1982*). Dieser dauert mehrere Stunden und wird als Kapazitation bezeichnet (*Austin 1951, 1960; Chang 1984*) und beginnt, sobald die Spermatozoen das Seminalplasma verlassen (*Robertson et al., 1988*). Der Prozess der Kapazitation kann experimentell durch bloßes Entfernen des Seminalplasmas induziert werden. Die Kapazitation ist bei den meisten Säugetierspezies hormonabhängig:

Während Östrogene, die im Follikelmilieu vorherrschen, die Kapazitation begünstigen respektive induzieren, vermag Progesteron diese zu hemmen oder sogar wieder rückgängig zu machen (*Williams, 1972*).

Für die Penetration der Zona pellucida wird unter anderem eine Änderung der Motilität kapazitierter Spermatozoen verantwortlich gemacht (*Katz et al., 1993*). Die progressiv gerichtete Motilität nicht kapazitierter Spermatozoen ändert sich zu Gunsten einer ausgeprägten Auslenkung der Flagellen mit seitlicher Kopfauslenkung (*Burkman, 1990*). Obwohl noch nicht alle Details der Kapazitation aufgeklärt sind, sprechen die bisherigen Ergebnisse dafür, dass ein Teil dieses Prozesses Modifikationen der gesamten Spermatozoen-Plasmamembran sind (*Austin 1960*). Hierdurch kommt es zur Membrandepolarisation (*Williams, 1972; Yanagimachi et al., 1973, Austin, 1975, Olson & Hamilton, 1978*). Es ändert sich die Lipidzusammensetzung und dadurch die Membranfluidität (*Ravnik et al., 1993; Langlais & Roberts, 1985; Yangimashi, 1994; Visconti et al., 1998*). In der Folge erwerben die Spermatozoen die Fähigkeit zur akrosomalen Reaktion (AR) und Bindung an die Zona pellucida (*Fraser, 1998; Jaiswal et al., 1998*).

1. 3. 2. Akrosomale Reaktion

Die AR ist ein exozytischer Prozess, deren ultrastrukturelle Veränderungen von Barros et al. (1967) beschrieben wurden (Abb. 8). An der AR und an der Bindung an der Zona pellucida ist unter anderem Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) beteiligt (Foresta et al., 1991; Köhn et al., 1995; Hagman et al., 1998).

Es sind sowohl physiologische, wie nicht-physiologische Induktoren der AR bekannt:

Zu den *physiologischen* zählen unter anderem Follikularflüssigkeit (*Mukerjee & Lippes, 1972, Oliphant et al., 1977; Miska et al., 1994*), Cumulus oophorus (*Siiteri et al., 1988*), Progesteron (*Osman et al., 1989; Blackmore et al., 1990, Morales et al., 1992*) Zona pellucida-Proteine (*Bleil & Wasserman, 1983; Cross et al., 1988; Henkel et al., 1998a*), Glycosaminoglycane wie Heparin und Hyaluronsäure (*Handrow et al., 1982; Delgado et al., 1988*), sowie biogene Amine wie Katecholamine (*Meizel & Working, 1980*).

Zu den *nicht-physiologischen* Induktoren der AR gehört beispielsweise Calcium-Ionophor A23187 (*Green, 1978; Jamil & White, 1981; Mortimer & Camenzind, 1989*). Es macht die Membran für Calcium permeabel, die Auslösung der AR erreicht maximale Werte (*Tesarik, 1985*). Ein physikalischer Induktor ist niedrige Temperatur (4°C) (*Mahi & Yanagimachi, 1973; Sanchez et al., 1991*).

Gehen Spermatozoen zugrunde kommt es zur „falschen“, degenerativen akrosomalen Reaktion (*Meizel, 1978*) ohne die charakteristische Fusion der akrosomalen Membran mit der Plasmamembran.

Als Second-messenger dient vermutlich die G-Protein-vermittelte Aktivierung von Phospholipase C, auch wenn mehrere, unter anderem Proteinkinase A und die Guanylatcyclase, beschrieben werden (*Zaneveld et al. 1991*). Die aktivierte Phospholipase C führt zur Depolarisation spannungsabhängiger Ionenkanäle, die einen Calciuminflux ermöglichen, welcher die AR einleitet (*Storey & Kopf, 1991*). Die aktivierten G-Proteine führen weiterhin zur Generierung von cAMP und darüber zur Phosphorylierung verschiedener Proteine (*Brucker & Lipford, 1995*). Zunächst kommt es zur partiellen Verschmelzung der Plasmamembran und der akrosomalen Membran. Es entstehen Hybridmembranvesikel, die hydrolytische Enzyme beinhalten (Proteasen wie Hyaluronidase und Akrosin, N-Acetyl-Glucosidaminidase und Glukuronidase) und freisetzen. Die innere akrosomale Membran wird zur Spermatozoenoberfläche, die nun unter anderem Akrosinmoleküle aufweist. Die proteolytischen Enzyme auf der Spermatozoenoberfläche binden und lysieren nun die Zona pellucida. Der distale Anteil der akrosomalen Membran bleibt zunächst erhalten und verschmilzt mit der Plasmamembran. An dieser Stelle beginnt die Vereinigung von Eizelle und Spermatozoon (*Austin & Bishop, 1958; Barros et al., 1967; Meizel 1985, Langlais &*

Roberts, 1985; Yudin et al., 1988). Die AR induziert neben den erwähnten Membranveränderungen auch Proteinmodifikationen im äquatorialen und postakrosomalen Bereich des Spermatozoons, wodurch die Fusion der Zellmembranen von Spermatozoon und Eizelle ermöglicht wird (Rochwerger et al., 1992). Die Aktivierung der Eizelle führt zum so genannten Polyspermieblock (siehe unten).

| | |
|---------------------------|---|
| Spermatozoenplasmamembran | 1 |
| äußere akrosomale Membran | 2 |
| Akrosomale Matrix | 3 |
| Innere akrosomale Membran | 4 |
| Kernmembran | 5 |
| Nukleus | 6 |
| Äquatorialssegment | 7 |

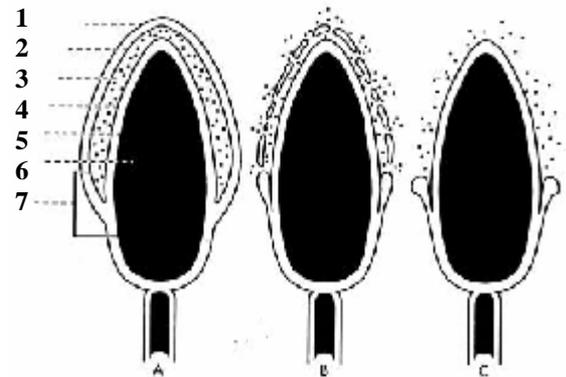


Abb. 4: Akrosomreaktion (AR)

A) Vor der AR, B) Während der AR: Multiple Fusionen zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomalen Membran mit Freisetzung des akrosomalen Inhalts, C) Abgeschlossene AR mit Exponieren des äquatorialen Segments. (modifiziert nach Lipshultz et al., 1997)

1. 3. 3. Zona pellucida-Interaktion und Polyspermieblock

Die ZP stellt eine Barriere für die Spermatozoen dar, sie umgibt die Oozyte und enthält eine Vielzahl charakteristischer Glykoproteine. Nach Wassarman (1987) lassen sich in der ZP drei charakteristische Glycoproteine nachweisen, die er im Mausmodell als ZP1 (Strukturprotein), ZP2 und ZP3 (beides Bindungsproteine) bezeichnete. ZP3 soll die AR induzieren und Ligand des Spermatozoenrezeptors sein (Bleil & Wassarman, 1986, Yanagimachi, 1994)). Die Interaktion der ZP mit den Spermatozoen ist ein wichtiger Schritt im Fertilisationsprozess, der speziesspezifisch ist (Swenson & Dunbar, 1982; Menkveld et al., 1991). Der so genannte Polyspermieblock wird durch die Fusion des Spermatozoons mit der ZP induziert und verhindert das Eintreten mehrerer Spermatozoen in die Eizelle (Wolf, 1981; Sathananthan & Trounson, 1982). Man unterscheidet den schnellen Polyspermieblock, der eine Depolarisation der Eizellmembran durch das eindringende Spermatozoon darstellt vom langsamen, definitiven Polyspermieblock (=Kortikalreaktion). Hierbei kommt es zur Ausschüttung von oberflächlich angeordneten zytoplasmatischen Vesikeln (sog. Kortikalgranula) in den perivitellinen Raum. Die ausgeschütteten Enzyme verhindern das Ankoppeln anderer Spermatozoen an die Oberflächenmembran der Eizelle und härten die Zona pellucida aus.

1. 3. 4. Akrosin

Neben den Zona pellucida-Proteinen besitzen vermutlich weitere Komponenten der Plasmamembran und der inneren akrosomalen Membran Rezeptoreigenschaften. So sollen beispielsweise Proakrosin- und Akrosinmoleküle eine wichtige Rolle spielen (*Jones et al., 1988; Jones, 1991; Töpfer-Petersen & Henschen, 1987; Urch & Patel, 1991*). Akrosin ist eine säugetierspezifische, trypsinähnliche Serinproteinase, die während der AR freigesetzt wird, (*Stambaugh, 1978; Harrison et al., 1982; Hedrick et al., 1988; Zaneveld & DeJonge, 1991*). Die Aktivität im Ejakulat beträgt 50-200mU/ml. Proakrosin ist die zymogene Form und kommt in frisch ejakulierten Spermatozoen vor. Die biochemische Struktur von Akrosin (*Fock-Nüzel et al., 1984; Schill et al., 1988*) sowie der Genlocus (*Klemm et al., 1991; Kremling et al., 1991*) wurden determiniert. Fehlt Akrosin oder wird die Umwandlung von Proakrosin zu Akrosin durch Inhibitoren wie Benzamidin (*Brown & Harrison, 1978*) gehemmt, kommt es nicht zur Fertilisation (*Stambaugh & Buckley, 1970; Zaneveld et al., 1970; 1971; Wolff et al., 1976; Schill et al., 1981; Liu & Baker, 1993; Moore et al., 1993*). Die nichtenzymatische Moleküldomäne des Proakrosins bindet an ZP2 und hat somit Rezeptoreigenschaften. Nach partieller Aktivierung soll Akrosin, der enzymatisch aktive Teil, für die lokale Auflösung der Zona verantwortlich sein (*Urch et al., 1985a, b*). Akrosin ist somit ein wesentlicher Faktor für die Zonabindung und -penetration der Spermatozoen (*Rogers & Bentwood, 1982; Polakoski & Siegel, 1986; Töpfer-Petersen & Henschen, 1987; Tesarik et al., 1988a*) Weiterhin soll Akrosin an der Kapazitation, an der Triggerung der AR (*Marushige & Marushige, 1978; Meizel, 1985; Habenicht, 1987*) und an der Chromatidekondensation während der Ausbildung des männlichen Vorkerns (*Habenicht, 1987; DeJonge et al., 1989; Nuzzo et al., 1990*) beteiligt sein. Über eine Freisetzung von Kininen aus Kininogenen soll Akrosin zudem zu einer Stimulation der intrauterinen Spermatozoen-Migration beitragen (*Schill et al., 1979; Kaneko & Moriwaki, 1981; Schill & Miska, 1992*). Wird die Akrosinaktivität beispielsweise durch Trypsin-Inhibitoren aufgehoben, ist eine ZP-Penetration nicht möglich, zudem ist die AR der ZP-gebundenen Spermatozoen reduziert (*Liu & Baker, 1993; Llanos et al., 1994*). An die Spermatozoen-Eizellfusion schließt sich die 2. Reifeteilung an. Der Plasmogamie folgt die Karyogamie. Mit Ausbildung der Zygote ist die zelluläre Befruchtung (Gametenverschmelzung; Syngamie) abgeschlossen und es erfolgt die 1. Furchungsteilung (*Alberts et al., 1990*). *In vitro* kann die Fusionsfähigkeit menschlicher Spermatozoen mit dem 1976 von Yanagimachi et al. entwickelten Hamster-Ovum-Penetrationstest beurteilt werden.

1. 4. Pharmakologie des Renin-Angiotensin-Systems (RAS)

Exogene und endogene Faktoren beeinflussen die Bewegung humaner Spermatozoen z. B. durch Wechselwirkung von Peptiden mit Rezeptoren auf der Spermatozoenmembran. Sie lassen sich heute differenzieren, beschreiben und pharmakologisch beeinflussen.

Eines dieser Systeme ist das *Kallikrein-Renin-System* (Abb. 5, S. 22). Andere Bezeichnungen wie *Renin-Angiotensin-System (RAS)* und *Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)* belegen die enge Verknüpfung mit anderen Faktoren der Körperhomöostase.

Der Begriff RAS betont die Kaskade ausgehend von Angiotensinogen und vernachlässigt die Kininogen-Kaskade. Da sich diese Arbeit mit der Angiotensinogen-Kaskade beschäftigt, wird im weiteren Verlauf der Begriff RAS benutzt.

1. 4. 1. Physiologie des RAS

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) wurde in vielen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen (*Campbell, 1987; Johnston, 1992, vergleiche Tabelle 2, S. 28*). Es reguliert unter anderem Herzkreislaufsystem und Wasserhaushalt des menschlichen Organismus über eine komplexe und fein abgestimmte Peptidkaskade (Abb. 5), (*Peach, 1977, Reid et al. 1978, Phillip, 1987, Stroth & Unger 1999, De Gasparo et al. 2000*). Das Grundschemata der Kaskade kann durch eine Vielzahl weiterer Enzyme wie Chymase und verschiedene Endopeptidasen ergänzt werden. Die beiden Peptidkaskaden laufen prinzipiell unabhängig voneinander ab und sind durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) miteinander verbunden.

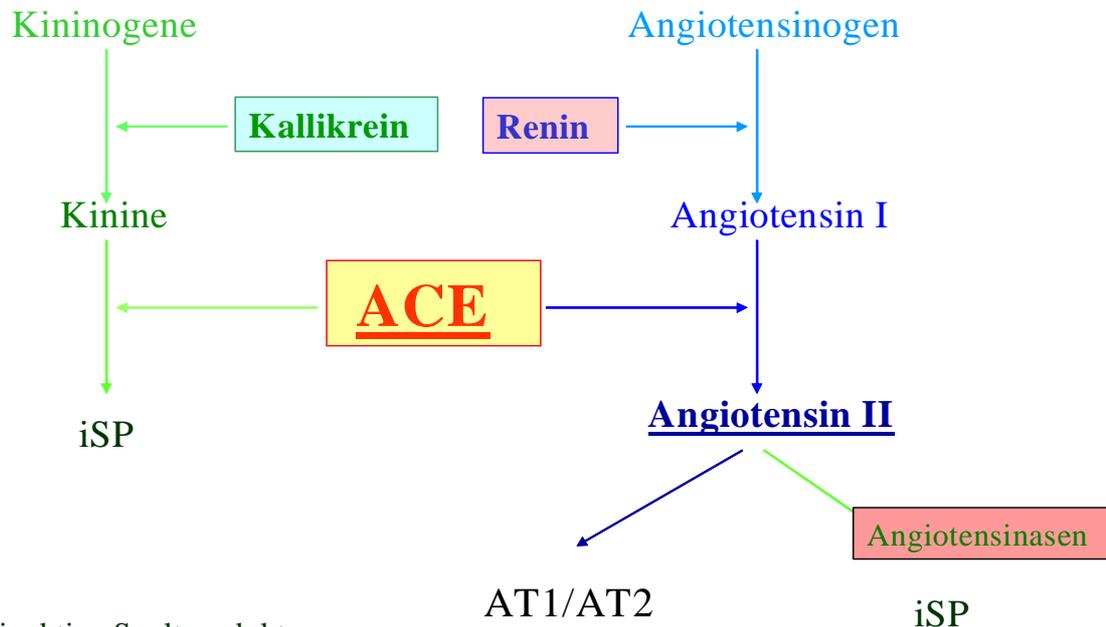
Das **Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)** regelt, neben anderen Mechanismen, kurz und mittelfristig den **Blutdruck** (*Knox & Granger 1987, Johnston et al., 1992, Sabolic & Brown 1995*):

Intravasaler Volumenmangel führt unter anderem zu Hypoperfusion der Nieren. Sinkt der Blutdruck in den Nierengefäßen um mehr als 10-15mmHg, wird konsekutiv aus den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparates, unter anderem über β_1 – Adrenorezeptoren vermittelt, das proteolytische Enzym Renin freigesetzt.

Tabelle 2 (S. 28) gibt einen Überblick über die *Verteilung von AT1 und AT2* im Körper, deren Transduktionsweg sowie die daraus resultierenden Wirkungen. Es gibt Hinweise darauf, dass im männlichen Reproduktionstrakt auch AIV synthetisiert wird. So lassen sich in der Prostata AIV-Rezeptoren nachweisen, deren Funktion jedoch bislang weitgehend unklar ist (*Dinh et al. 2001b*).

Neben einer starken vasokonstriktorischen Wirkung über AT1 fördert AII die Sekretion von Antidiuretischem Hormon (ADH, Vasopressin) aus dem Hypophysenhinterlappen (der

erhöhte Dehnungszustand der Herzvorhöfe, als Zeichen einer Hypervolämie hemmt die ADH-Sekretion, sog. *Gauer-Henry-Reflex*, niedriger Dehnungszustand fördert die ADH-Sekretion).



iSP= inaktive Spaltprodukte

AT1/AT2: Angiotensin 2 -Rezeptor Typ1/Typ2

ACE: Angiotensin Converting Enzyme

Abb. 5: Kallikrein-Renin-System:

Die Kaskade hat zwei Arme, die durch die Dipeptidylcarboxypeptidase Angiotensin-Converting-Enzym (ACE, Kininase II) miteinander verbunden sind: Auf der einen Seite führt Kallikrein zur Bildung aktiver Kinine aus den Vorstufen, den Kininogenen. ACE inaktiviert die Kinine. Auf der anderen Seite führt Renin zur Bildung von Angiotensin I (AI) aus dem α_2 -Globulin Angiotensinogen, dass hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird. AI wird durch ACE in das aktive Peptid Angiotensin II (AII) überführt. AII vermittelt seine Wirkungen hauptsächlich über AII-Rezeptoren Typ 1 und 2 (AT1 und AT2).

ADH reguliert die Permeabilität der Sammelrohre für H₂O und reguliert so die Osmolarität des Blutes, es hat in höherer Konzentration ebenfalls eine vasokonstriktorische Wirkung, daher das Synonym Vasopressin. Weiterhin fördert AII die Freisetzung von Aldosteron aus den Nebennierenrinden, weswegen das RAS oft auch als „Renin-Angiotensin-Aldosteron-System“ (RAAS) bezeichnet wird. Aldosteron fördert die Natrium-Rückresorption in den distalen Nephronabschnitten und reguliert so das intravasale Volumen. Neben dem systemischen RAS, lässt sich auch ein **lokales RAS** identifizieren, das sich in verschiedenen

Gewebe, auch dem Reproduktionstrakt nachweisen lässt (*Deschepper et al., 1986; Soubrier und Corvol, 1990; Mulrow 1992; Dostal et al., 1992; Philips et al., 1993; Hagamann et al., 1994*). Dieses lokale RAS wird vermutlich nicht durch das systemische RAS reguliert. Angiotensinogen wird lokal produziert und parakrin sezerniert. Für Ratten ließ sich eine Regulation durch hypophysäre Regulationsmechanismen nachweisen (*Naruse et al., 1984*). Die lokale Reninproduktion ließ sich durch Hypophysektomie reduzieren, humanes Choriongonadotropin (HCG) hingegen, konnte die Produktion stimulieren. Okuyama et al. (1988) konnten einen Konzentrationsanstieg von Renin und Angiotensin II in der Vena spermatica von Männern nachweisen, die mit HCG behandelt wurden.

Die Funktion des lokalen RAS ist bei weitem nicht für alle Gewebe geklärt (*Vinson et al., 1997*). Die erwähnten Studien haben jedoch eine Vielzahl von Mechanismen und Zusammenhängen mit dem Vorgang der Reproduktion hervorgebracht, die eine wichtige Bedeutung des RAS für die menschliche Reproduktion vermuten lassen (*O'Mahony et al., 2000, Leung et al., 2003*, siehe Tabelle 6, S. 117). Gewebeständiges RAS wurde mehrfach im Reproduktionstrakt nachgewiesen (*Pandy et al., 1984; Vinson et al., 1995, 1997*).

1. 4. 1. 1. Renin

Renin ist ein **Glykoprotein** aus 340 Aminosäuren, es wird im Bereich des juxtaglomerulären Apparates von spezialisierten Zellen des *Vas afferenz* in die Blutbahn abgegeben.

Sekretionsstimuli sind Abfall des renalen Perfusionsdruckes, Abnahme des Na⁺-Bestandes des Organismus sowie sympathische Aktivierung über β_1 -Rezeptoren.

Als **Protease** spaltet es vom α_2 -Globulin Angiotensinogen, welches in diesem Falle hauptsächlich aus der Leber stammt, das Dekapeptid Angiotensin I (AI) ab (*Abb. 9 und 10*). Neben Renin lassen sich im Seminalplasma noch andere Enzyme identifizieren, die Angiotensinogen aufspalten. Unter anderem entstehen *Angiotensin 3* (= *des-Asp1-Angiotensin 2*) und *Angiotensin 1-7* oder *Angiotensin 4* (*Angiotensin 6-8*). Für letztere wurden spezifische Bindungsstellen an Zellmembranen beschrieben (*Millerwing et al., 1993*).

AI wird durch die *Dipeptidylcarboxipeptidase Angiotensin Converting Enzyme (ACE)* in *Angiotensin II* (AII) überführt. AII ist somit ein Octapeptid. Die vasokonstriktive Potenz ist 10 bis 40 Mal größer, als die von Noradrenalin (*Stock et al. 1995; Unger et al., 1990*). AII kann die Blut-Hoden-Schranke nicht passieren (*Ehlers und Riordan, 1989*). Die Quelle lokal gebildeten AII ist nicht für alle Gewebe geklärt. Für Nebennierenzellen, Leydigzellen und den Nebenhoden gibt es Untersuchungen, die belegen, dass die Effektorzellen selbst die Quelle von AII sind (*Pandey et al., 1984; Urata et al., 1994a; Zhao et al., 1996*).

1. 4. 1. 2. ACE

ACE ist eine *Dipeptidylcarboxypeptidase*: es spaltet also ein *Dipeptid* vom *C-terminalen* Ende des AI ab.

Weiterhin inaktiviert ACE Kinine (*Soubrier et al., 1994*), weswegen es auch als Kininase II bezeichnet wird. ACE ist ein membrangebundenes Enzym, das vor allem in der Lunge an der luminalen Seite des Gefäßendothels vorhanden ist.

Abbildung 6 zeigt die chemische Struktur der beschriebenen Peptidkaskade und den Ansatzpunkt von ACE am AI-Molekül. Auch bei vollständiger Hemmung des ACE kann immer noch AII entstehen. Dies geschieht unter anderem durch ein als Chymase deklariertes Enzym. Dies erklärt, dass eine Blockierung der Rezeptoren zu einem völligen Wirkungsverlust führen kann, eine Hemmung des Enzyms ACE hingegen nicht. Allgemein als Angiotensinasen bezeichnete Enzyme führen zur Inaktivierung des Octapeptids AII, welches seine Wirkung über spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran vermittelt. Diese Rezeptoren werden einschlägig als AII-Rezeptoren bezeichnet. Membrangebundenes Angiotensin Converting Enzym (ACE) wurde zudem auf humanen Spermatozoen nachgewiesen (*Köhn et al., 1998a*). Während der Kapazitation zeigte sich in mehreren Studien die Freisetzung von ACE von der Zelloberfläche (*Foresta et al., 1987, Köhn et al., 1995*).

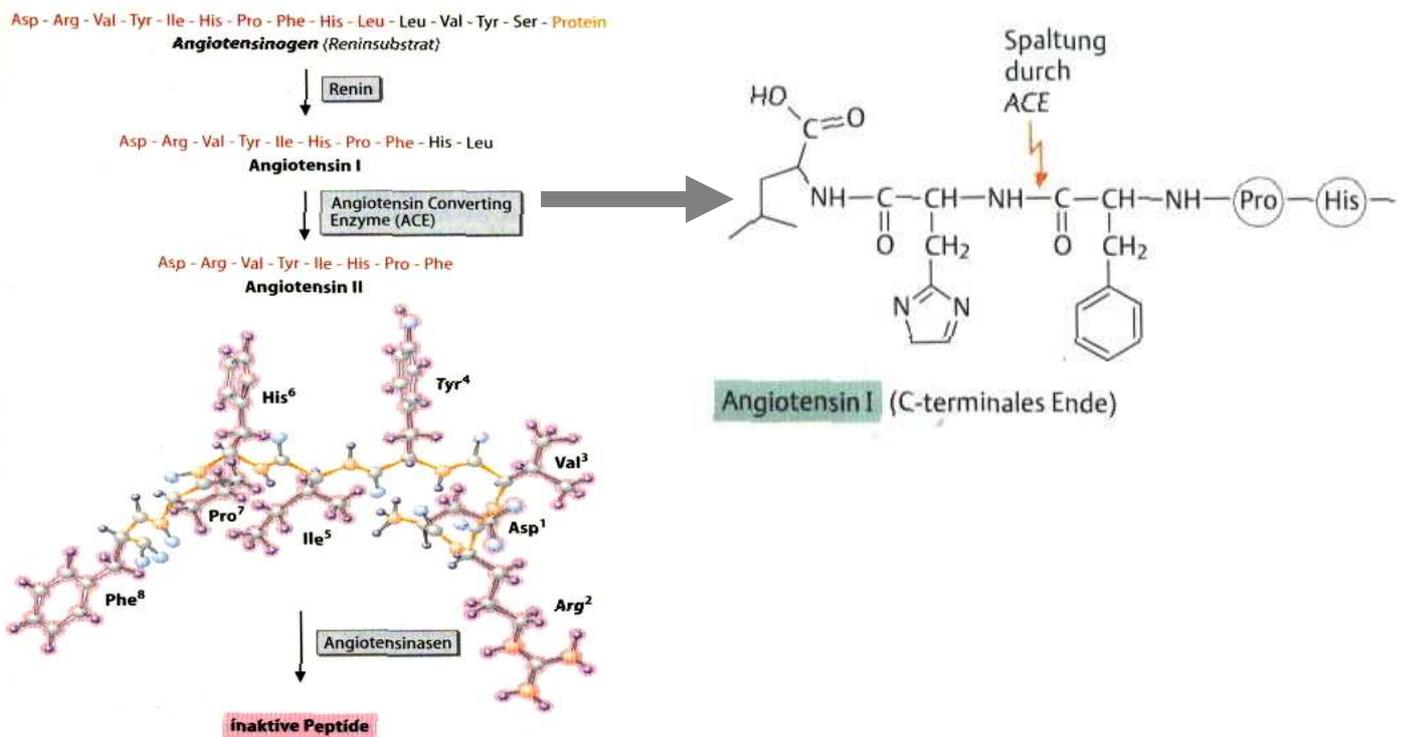


Abb. 6: Die Angiotensin-Kaskade (links, modifiziert nach Löffler & Petrides, 1999) und der genaue Wirkungsort von ACE (rechts, modifiziert nach Lüllmann & Moor, 1999).

1. 4. 1. 3. AII-Rezeptoren (AT)

Die meisten bekannten Wirkungen von AII werden durch diese spezifischen AII-Rezeptoren vermittelt (e. g. *Quali et al., 1992*). Es werden vor allem die *membrangebundenen AII-Rezeptoren* Typ 1 (AT1) und Typ 2 (AT2) unterschieden. AII-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der „*Sieben- Transmembrandomänen-Rezeptoren*“ und bestehen aus verschiedenen Untergruppen (*Murphy et al., 1991; Sasaki et al., 1991*). In der Regel unterscheidet man eine α - und eine β - Untereinheit. Die Signaltransduktion verläuft überwiegend über G-Proteine.

Der AT1 lässt sich in Ratten und Mäusen in zwei Varianten untergliedern, den AT1 A und AT1 B, welche zu 94% homolog sind (*Bergsma et al., 1992; Sandberg et al., 1992; Sasamura et al., 1992; Lewis et al., 1993*). Beim Menschen wurde diese Untergliederung nicht gefunden (*Bergsma et al., 1992*). Die beiden Untertypen sind homolog aber unterschiedlich reguliert (*Chaki und Inagami, 1992; Jarvis et al., 1992; Kitami et al., 1992*). Es gibt Hinweise auf weitere Untertypen des AT1 (*Chaki und Inagami, 1992; Jarvis et al., 1992; Song et al., 1992; Tsutsumi und Saavedra, 1992*). Die Differenzierung der Rezeptoren erfolgt nach molekularen und pharmakologischen Kriterien:

Es wird vermutet, dass die AT einer Rezeptorinternalisierung nach AII-Bindung unterliegen (*Vinson et al., 1997*). AII bindet mit gleicher Affinität an AT1 und AT2 (*de Gasparo & Whitebread, 1995*).

Die Klassifizierung der AT erfolgt nach ihrer Spezifität für die Bindung des Rezeptorantagonisten *Losartan*[®] (hochselektiv für AT1) und der Rezeptorantagonisten *CGP42112* oder *PD123177* (hochselektiv für AT2) (*Wong et al., 1990a; Smith et al., 1992*). Anders als AT2 wird AT1 durch *Dithiothreitol* und GTP-Analoga inhibiert (*Van Atten et al., 1993*).

AT2 bindet auch das in dieser Arbeit verwendete PD123319 hochselektiv.

Die AT sind artspezifisch verteilt (*Vinson et al., 1997, vergl. Tabelle 2, S. 28*). So weist die Nebennierenrinde der Ratte in der Zona Glomerulosa hauptsächlich AT1, im Nebennierenmark hauptsächlich AT2 auf. Beim Rind hingegen weist die Nebennierenrinde lediglich AT1 auf (*Balla et al., 1991*). Beim Menschen konnte im nicht graviden Uterus hauptsächlich AT2 nachgewiesen werden, während der nicht gravide Uterus der Ratte dagegen auch AT1 aufweist. Das Gehirn der Ratte weist AT1 und AT2 auf. Der AT2 dominiert allerdings im neonatalen Gewebe und bei Jungtieren (*Millan et al., 1991; Tsutsumi und Saavedra, 1991*). In Ratten- und Rinderovar herrscht AT2 vor (*Pucell et al., 1991; Aiyar et al., 1993*), während in anderen Geweben die Verhältnisse zwischen AT1 und AT2 variieren

(Montiel et al., 1993). Im Rattenhoden wird die AII Rezeptor-Expression über die hypothalamisch- hypophysäre Gonadenachse gesteuert und es gibt Hinweise darauf, dass AII am Hodenwachstum und/oder an dessen Differenzierung beteiligt ist (Hirai et al., 1998).

Neben den AT existieren noch zwei weitere spezifische AII Bindungsstellen im Nebennierengewebe der Ratte (Montiel et al., 1993, Vinson et al., 1997), auf die hier jedoch nicht näher eingegangen wird.

1. 4. 1. 3. 1. AII-Rezeptor Typ 1 (AT1)

AT1 wird durch den Rezeptorantagonisten *DuP753* (*Losartan*[®]) hochselektiv gebunden (Wong et al., 1990a; Smith et al., 1992). Anders als AT2 wird AT1 durch *Dithiothreitol* und GTP-Analoga inhibiert (Van Atten et al., 1993).

Das Gen für den AT1 findet sich auf *Chromosom 3* (Guo et al., 1994). Die cDNA kodiert für ein 359 Aminosäuren langes Protein, das sieben transmembranäre Regionen besitzt. Diese Konstellation ist typisch für G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren (Murphy et al., 1991; Sandberg et al., 1994). Die transmembranäre Domäne und die extrazelluläre Schleife spielen eine entscheidende Rolle bei der Bindung von AII.

Die Bindungsstelle für AII unterscheidet sich von der Bindungsstelle für AT1-Antagonisten. Letztere interagieren lediglich mit der transmembranären Domäne des Rezeptors. Wie die meisten G-Protein gekoppelten Rezeptoren, unterliegt der AT1 einer *Rezeptorinternalisierung* nach der Bindung von AII. Dieser Effekt wird durch zytoplasmatische Anteile des Rezeptors vermittelt (Thomas et al., 1996).

Die Signaltransduktion des AT1 ist allerdings abhängig von den jeweiligen Geweben (Vinson et al., 1997). Während zum Beispiel der Rezeptor an Endothelzellen und glatten Muskelzellen weitgehend auf der Zellmembran verbleibt, herrscht in Nebennierenzellen und Epithelzellen die Rezeptorinternalisierung vor (Vinson et al., 1997).

In Glomerulosazellen kann das Inositol-Triphosphatsystem bereits an der Plasmamembran aktiviert werden, während zur Aktivierung der Proteinkinase C eine Rezeptorinternalisierung Voraussetzung ist (Kapas et al., 1994).

Anders als bei ACE- (Krege et al., 1995) und Angiotensinogen- (Tanimoto et al., 1994) Knockout-Mäusen, führt eine Deletion des AT1 bei der Maus zu keiner Störung von Entwicklung, Überleben oder Organdifferenzierung (Oliverio et al., 1998).

Obwohl seit einiger Zeit bekannt ist, dass der Hoden AT1 enthält (Kitami et al., 1992), wurde die Hauptlokalisation bislang den Leydigzellen zugesprochen (Dufau, 1988). In diesem Zusammenhang soll AII die Steroidproduktion durch Umwandlung von Cholesterol in

Pregnenolon induzieren. Weiterhin soll die Freisetzung von Gonadotropinen durch AII induziert werden (*Steele et al., 1981*).

1. 4. 1. 4. 2. AII- Rezeptor Typ 2 (AT2)

Der AT2 weist eine hohe Affinität für PD123319, PD123177 und CGP42112 auf. Hingegen ist die Affinität für Losartan[®] und Candesartan sehr gering (*Timmermans et al., 1993*). AT2 wird nicht durch Dithiothreitol oder GTP-Analoga, im Gegensatz zu AT1, inhibiert (*Van Atten et al., 1993*).

Der AT2 wurde bereits in vielen Spezies, inklusive dem Menschen beschrieben und geklont (*Koike et al., 1994; Martin & Elton, 1995*). Es handelt sich ebenfalls um einen „Sieben-Transmembran-Rezeptor“. Das Protein besteht aus 363 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 41 kDa. Beim Menschen ist es auf dem *X-Chromosom* kodiert (*Koike et al., 1994*). Die Aminosäuresequenz ist nur zu 34% homolog zu der des AT1 (*Mukoyama et al., 1993*). In der extrazellulären N-terminalen Domäne finden sich fünf Stellen, die eine N-Glykosylierung ermöglichen, weiterhin lassen sich 14 Cysteinreste identifizieren. Die zweite intrazelluläre Schleife besteht aus einer potenziellen Proteinkinase C Bindungsstelle. Das zytoplasmatische Ende weist drei Sequenzen auf, die durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden können und eine Bindungsstelle für die cAMP-abhängige Proteinkinase. Der dritten intrazellulären Schleife wurde eine besondere Rolle bei der Signaltransduktion beigemessen, indem sie die MAP-Kinase inaktivieren und Apoptose induzieren kann (*Lehtonen et al., 1997*).

Im Gegensatz zum AT1-Rezeptor ist gegenwärtig unklar, ob der AT2 auch an ein G-Protein gekoppelt ist, allerdings wurde die Kopplung an ein inhibitorisches G-Protein beschrieben (*Zhang & Pratt, 1996*).

Der AT2 ist besonders ausgeprägt während der Embryogenese exprimiert, nach der Geburt lässt er sich nur noch in geringer Menge nachweisen (*Lazard et al. 1994*).

AT2-Knockout-Mäuse entwickeln sich allerdings unauffällig, sodass die Bedeutung von AT2 in der fetalen Entwicklung bislang unklar bleibt. Auffallend ist jedoch die starke Expression von AT2 in pathologisch verändertem Gewebe. So lässt sich eine erhöhte AT2-Expression in infarziertem Myokard, ZNS-Läsionen und in Wundheilungsgebieten nachweisen. Das so genannte „Remodelling“ nach Myokardinfarkt wird unter anderem auf das lokale RAS zurückgeführt.

AT2 wird durch verschiedene Peptide aktiviert. Es bindet AII, Insulin, Insulin-Like-Growth-Factor (ILGF), Nerval-Growth-Factor (NGF), Interleukin 1 β sowie interferon-regulatory-factor 1 und 2 (IRF 1 und 2) (*Horiuchi et al., 1995; Ichiki et al., 1995a, b; Li et al., 1998*).

| Ort | Rezeptor typ | Signaltrans- duktionsweg | Akute Wirkung | Chronische Wirkung |
|--|-----------------|--------------------------------|---|---|
| Glatte Gefäßmuskulatur | AT1 | Phospholipase C | IP ₃ -vermittelte Vasokonstriktion mit Erhöhung des peripheren Widerstandes | DAG-vermittelte glattmuskuläre Proliferation, Hypertrophie, Hyperplasie |
| Nieren | AT1 | Phospholipase C | Durchblutung↓, ↑ GFR durch Konstriktion des vas efferens (über IP ₃) | |
| Nieren | AT1 | Hemmung der Adenylylcyclase | ↑ Na ⁺ -Rückresorption und H ⁺ -Sekretion im proximalen Tubulus | Hypervolämie |
| Nebennierenrinde (Zona glomerulosa) | AT1 (AT2 ?) | Phospholipase C | ↑Aldosteronsynthese und -freisetzung (DAG- vermittelt) | Hypervolämie, Blutdrucksteigerung |
| Nebennierenmark | AT1 (AT2 ?) | Phospholipase C | ↑Adrenalinfreisetzung (über IP ₃) | |
| Sympathische Nervenendigungen | AT1 | Phospholipase C | Erleichterung der Noradrenalinfreisetzung (über IP ₃) | |
| Herz | AT1 | Phospholipase C | | Hypertrophie (DAG-vermittelt ?) |
| Uterus | AT1 (AT2 ?) | Phospholipase C | Kontraktion (IP ₃ - vermittelt) | |
| Hypophysenhinter- lappen | AT1 | Phospholipase C | Vasopressin/ADH- Freisetzung (IP ₃ - vermittelt) | |
| Hypothalamus | AT1 (AT2 ?) | unbekannt | Durst | |

Tabelle 2: Überblick über die Lokalisation, Wirkungskaskade und Funktion von Angiotensin-II-Rezeptoren. Wirkung von AT2 unbekannt (daher „?“) GFR: Glomeruläre Filtrationsrate; IP₃: Inositol- 1, 4, 5-Trisphosphat; DAG: 1, 2-Diacylglycerol (modifiziert nach Forth et al., 2001)

Gerade in der Therapie der Herzinsuffizienz erlangen derzeit zwei Substanzklassen wichtige Bedeutung, die ACE-Hemmer und die AT1-Antagonisten:

1. 4. 2. Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer)

ACE-Hemmer sind Analoga der C-terminalen Peptidkette von AI. Die Namengebung verwendet stets die Endung „-pril“ (z.B. Captopril).

ACE-Hemmer und AT-1-Antagonisten (z.B. Losartan[®]) sind derzeit wichtige Medikamente in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz und verbessern deutlich die Prognose (*CONSENSUS-Studie 1987, SOLVD-Studie; 1991 und 1992*). Nach einem Myokardinfarkt bremsen sie das Remodelling im Infarktgebiet und verhindern bei einem Teil der Patienten die Progression einer Herzinsuffizienz (*SOLVD-Studie, Cohn et al. 1991, SAVE-Studie, Pfeffer et al., 1992*).

Studien zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei oraler Medikation bezogen auf andrologische Faktoren wie Spermatozoenzahl-, Motilität oder Fertilitätsraten konnten in einer aktuellen Medline-Recherche nicht gefunden werden (*eigene Recherche Oktober 2005: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Stichworte: human, male, fertility, ACE, Captopril, Lisinopril, ace inhibitor, reproduction*). Eine mutagene, carcinogene oder teratogene Wirkung wurde im Tierversuch für Moexipril ausgeschlossen (*Friehe et al. 1997, Gietl et al., 1998*). Es wurde jedoch häufiger beobachtet, dass ACE-Hemmer-Einnahme nach den ersten drei Schwangerschaftsmonaten zu Missbildungen oder sogar zum Abort führte (*CDC 1997, Tabacova et al., 2003*). Hierbei handelte es sich vor allem um renale Missbildungen mit entsprechenden Konsequenzen (Oligohydramnion und assoziierte Missbildungen), persistierenden Ductus arteriosus und intrauteriner Wachstumsretardierung. Diese retrospektiven Studien wiesen jedoch keine solchen Missbildungen nach Einnahme von ACE-Hemmern im ersten Schwangerschaftstrimester nach, was über die Entwicklung des urogenitalen Systems in der Fetalperiode erklärt wird. Grundlage der Studien waren Daten, die seit 1992 von der „*Organization of Teratology Information Services*“ (OTIS) in der so genannten „*ACEI Registry*“ (ACE-Inhibitor-Registry) dokumentiert werden. Diese sammelt Beobachtungen über unerwünschte Arzneimittelwirkungen in Zusammenhang mit ACE-Hemmer-Einnahmen und bildet so eine Grundlage für Untersuchungen. Weitere Studien sind allerdings notwendig, um die Zusammenhänge zwischen ACE und Fertilität aufzudecken.

Die heute verwendeten ACE-Hemmer binden das Zink im aktiven Zentrum mit ihrer Carboxylgruppe und hemmen somit die Umwandlung von AI in AII. Zusätzlich haben sie Einfluss auf die Inaktivierung von Kininen, woraus die alternative Bezeichnung Kininase II

resultiert. Dieser Funktionsweg wird zum Beispiel für das Auftreten des typischen Hustens (in bis zu 10%) unter ACE-Hemmer-Therapie verantwortlich gemacht, der über eine Erhöhung der Konzentration inflammatorischer Mediatoren wie Kinine und daraus hervorgehende Prostaglandine und Substanz P resultieren soll (Forth et al., 2001).

Es sind ACE-Hemmer verfügbar, die direkt wirksam sind (Captopril und Lisinopril) und solche, die als veresterte, inaktive Vorstufe vorliegen (Fosinopril, Quinapril, Ramipril) und erst in der Leber zur aktiven Form metabolisiert werden müssen.

Stellvertretend für die Gruppe der ACE-Hemmer ist in Abbildung 11 die Strukturformel von Lisinopril schematisiert.



Abb. 7: Strukturformel von Lisinopril. Ein ACE-Hemmer der direkt, ohne Metabolisierung, wirksam ist. (Forth et al., 2001).

1. 4. 3. AII-Rezeptor-Antagonisten (AT-Antagonisten)

Die zweite Substanzgruppe sind die so genannten AT1-Antagonisten. Sie gelten für bestimmte Indikationen als verlässliche Alternative zu den ACE-Hemmern und weisen weniger Nebenwirkungen auf. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass andere Peptidkaskaden, in denen ACE wirksam ist, nicht beeinflusst werden (Forth et al., 2001). Ihre Nomenklatur verwendet die Endung „-sartan“ (z.B. Losartan®). Anfang der 70er Jahre wurden peptidische AT-Antagonisten wie Saralasin entwickelt. Es ist ein Peptidanalogen des AII mit drei substituierten Aminosäuren: *Sar-Val-Ala-Ang II*. Diese Substanzgruppe hat antagonistische aber auch agonistische Wirkungen (partieller Agonismus). Saralasin konnte in Versuchen an isolierten Ovarien die Ovulation verhindern (Peterson et al., 1993). Die kurze Halbwertszeit und die mangelnde orale Bioverfügbarkeit machten die Entwicklung nichtpeptidischer AT-Antagonisten wie Losartan® (DuP753) notwendig, einem biphenylischen AT1-Antagonisten mit einer Selektivität > 10000fach für den AT1. Diese Substanzklasse ist oral bioverfügbar und dissoziiert nur langsam vom Rezeptor. In der Leber

wird Losartan[®] (DuP753) zum 20fach potenteren EXP-3174 umgewandelt, einem im Gegensatz zu Losartan[®], nichtkompetitiven Antagonisten (Abb. 12).

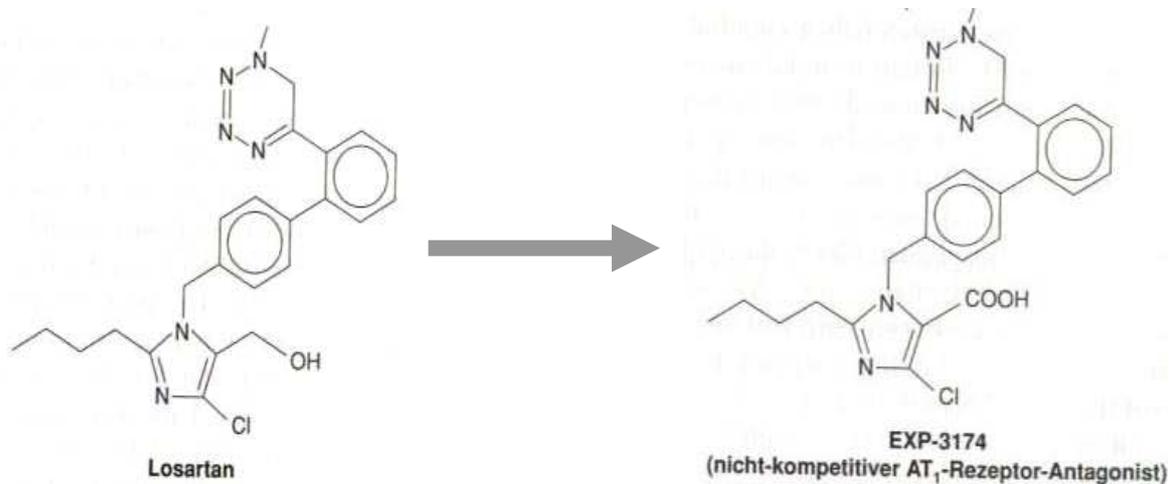


Abb. 8: Strukturformel von Losartan[®] (DuP753). Darstellung der Umwandlung in der Leber zu EXP-3174 (Forth et al., 2001).

Für die Experimente in dieser Arbeit wurde der spezifische AT₁-Antagonist **Losartan[®] (DuP753)**, der spezifische AT₂-Antagonist **PD123319** und der unspezifische, peptidische AT-Antagonist **Saralasin** verwendet. Letzterer blockiert somit beide Angiotensin-Rezeptoruntertypen AT₁ und AT₂.

Ein weiteres Prinzip der Hochdrucktherapie ist die Blockade von Renin. Hier wurden kürzlich oral bioverfügbare Substanzen entwickelt, deren erster Vertreter Aliskiren, bereits den ACE-Hemmern vergleichbare Ergebnisse zeigt.

2. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurden zunächst die Einflüsse von Angiotensin II auf die Motilität humaner Spermatozoen sowie die beteiligten Rezeptoren untersucht. Es soll herausgearbeitet werden, ob AII ein geeigneter Kandidat für den Einsatz in den Methoden der assistierten Reproduktion zur Steigerung der Spermatozoenmotilität ist.

Die bisherigen Studien wurden statistisch nicht korrekt ausgewertet und können somit nicht als Grundlage dienen.

Es wird zudem der Einfluss von Pharmaka auf die beobachteten Effekte untersucht. Dies gibt unter anderem Hinweise auf den Rezeptortyp und die Rezeptorspezifität beteiligter AII-Rezeptoren. Weiterhin wird durch die Untersuchung von Ejakulat vasktomierter Männer im Vergleich zu gesunden Probanden der bislang in der Literatur kontrovers diskutierte Produktionsort des im Ejakulat nachweisbarem AII eingegrenzt (*Leung et al., 2003, O'Mahony et al., 2005*).

Mit Hilfe der CASA (= Computer Assisted Sperm Motion Analyzer) wurde der Einfluss von Angiotensin II (AII), sowie verschiedener Angiotensin II-Rezeptorantagonisten auf die Funktion humaner Spermatozoen untersucht. Dies ist ansatzweise bereits erfolgt (*Vinson et al., 1995*). Die Ergebnisse wurden jedoch mit parametrischen Tests ausgewertet, was bei nicht standardnormalverteilten Werten, wie den Motilitätsparametern humaner Spermatozoen, nicht zulässig ist. Statistisch korrekte Resultate wurden daher bislang nicht veröffentlicht. Dies soll in dieser Arbeit geleistet werden. Zudem bestehen noch immer widersprüchliche Meinungen über die Relevanz des RAS im männlichen und weiblichen Reproduktionstrakt (*Kim et al., 1995*), somit ist die definitive Bedeutung dieses Systems für die Reproduktion noch weitgehend unklar (*Leung et al., 2003*).

Weiterhin erfolgten die bisherigen Motilitätsmessungen bis zu einem maximalen Zeitabstand von 30 Minuten nach Zugabe des Peptides. Sollte AII jedoch in den Methoden der assistierten Reproduktion zum Einsatz kommen, ist die Frage zu klären, ob dieser Effekt zu einem späteren Zeitpunkt noch besteht und ob diese Effekte durch Aufbereitungsschritte, wie das Waschen der Spermatozoensuspension negativ beeinflusst wird. Zur Klärung dieser Frage wurden die Untersuchungszeitpunkte in dieser Arbeit auf 15 und 60 Minuten, sowie im Anschluss an einen Waschschrift gewählt.

Die weiteren Methoden dienten dem Nachweis und der Charakterisierung der beteiligten Angiotensin II-Rezeptoren AT1 und AT2 (= Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 und Typ 2) an der Spermatozoenmembran. Für den AT2 gab es bislang nur indirekte Hinweise auf dessen Existenz auf humanen Spermatozoen, z.B. durch Einsatz von AT2-Antagonisten und

Beobachtung einer Wirkung (Köhn *et al.*, 1998). Ein direkter Nachweis war bislang nicht gelungen. Mittels Western-Blot sollten die AT1 und AT2 qualitativ nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die Immunzytochemie zum Nachweis und zur Lokalisierung von AT1 und AT2 eingesetzt, um den Rezeptor erstmals in seiner Umgebung zu sehen.

In der statistischen Auswertung wurde auf Unterschiede zwischen Patienten der andrologischen Ambulanz sowie gesunden Probanden untersucht.

Zusammenfassend soll die Arbeit einen Überblick über die genaue Lokalisation von AT1 und AT2 auf humanen Spermatozoen aufzeigen, die bislang beschriebenen Bestandteile des RAS auf humanen Spermatozoen damit ergänzen und Hinweise auf deren physiologische Funktion geben. Der bislang unklare Entstehungsort von AII soll näher eingegrenzt werden. Dabei sollen die Versuche die Möglichkeiten eines Einsatzes in den Methoden der assistierten Reproduktion auch im Versuchsaufbau berücksichtigen und den zeitlichen Verlauf der beobachteten Effekte näher beschreiben.

Diese Arbeit nimmt sich zum Ziel, einen Teil zum Verständnis der Funktionsweise menschlicher Spermatozoen beizutragen und Möglichkeiten aufzuzeigen, die Effizienz der Methoden der assistierten Reproduktion durch Zusatz körpereigener, im natürlichen Milieu vorhandener Hormone, in physiologischer Dosierung und somit praktisch nebenwirkungsfrei, zu steigern. Es bestünde damit die Möglichkeit, mehr ungewollt kinderlosen Paaren zu helfen, einem Teil von ihnen invasivere Verfahren zu ersparen und schließlich auch einen Teil der Kosten mit günstigen Mitteln, durch einen früheren erfolgreichen Therapieabschluss zu senken.

Anmerkung: Es wurden zusätzlich Motilitätsparameter (VSL, VAP und VCL), sowie die Wirkung von Angiotensin I untersucht und ausgewertet. Weiterhin wurden HPLC-Untersuchungen zum Abbau von AI im Seminalplasma und durch humane Spermatozoen durchgeführt. Aufgrund der enormen Datenmenge war es leider erforderlich, auf diesen Teil der Experimente in dieser Inauguraldissertation zu verzichten.

3. Material und Methoden

3. 1. Herstellung der Inkubationsmedien

Je nach Versuch wurden die Spermatozoen nativ belassen, in HTF- HSA -Medium (= „Human Tubal Fluid“- Medium nach Quinn et al. 1985, unter Zusatz von **H**umanem **S**erum **A**lbumin) oder PBS (= **P**hosphate **B**uffered **S**alina) zur weiteren Versuchsdurchführung resuspendiert.

- **HTF-1% HSA** (= Human-Tubal-Fluid + humanes Serum Albumin)

- **PBS** (= Phosphate-Buffered Salina)

HTF-Medium nach Quinn et al., 1985:

NaCl: 101,6mM, KCl: 4,69mM, CaCl*2H₂O: 2,04mM, MgSO₄*7H₂O: 0,2mM, KH₂PO₄: 0,37mM, NaHCO₃: 25,0mM, Glucose: 2,78mM wasserfrei, NaPyruvat: 0,33mM, Na Laktat : 21,4 mM (60% Syr), HEPES: 20, 0 mM

Zur Stabilisierung wurden Penicillin 0,06 g/l und Streptomycin 0,05g/l zugefügt. Als ph-Indikator diente Phenolrot als Zusatz von 0,005g/l.

Die Osmolarität wurde in einem Osmometer OM 801 (Firma Vogel, Gießen) auf 280 bis 290 mM eingestellt. Der ph betrug 7,4. Anschließend wurde das Medium über Sterivex-GV 0, 22µm-Filter steril filtriert und in 250-ml-Zellkulturflaschen gefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C unter lichtarmen Bedingungen maximal 4 Wochen. Das fertige Medium wurde vor Anwendung 30 Minuten bei 37°C vorgewärmt. HSA wurde dem Medium bei Bedarf in einer Konzentration von 1 % (10mg/ml) zugegeben. PBS wird in Tablettenform geliefert. Eine Tablette wurde in 100ml Aqua dest. unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers gelöst.

3. 2. Auswahl der Spender

In dieser Studie wurden Ejakulate gesunder, junger Probanden, von Patienten der andrologischen Ambulanz und von vasektomierten, zuvor fertilen Männern der urologischen Praxis Dr. med. Braun in Gießen verwendet). Die verwendete Anzahl variierte je nach Versuchsaufbau. Für die Immunzytochemie wurden Ejakulate von 10 gesunden jungen Probanden untersucht. Für den Westernblot wurden Ejakulate von drei gesunden, jungen Probanden verwendet. Für den ELISA wurden Ejakulate der drei beschriebenen Gruppen mit jeweils 13 Probanden und für die HPLC Ejakulate dreier gesunder, fertiler Probanden eingesetzt. Für die Motilitätsmessungen Ejakulate von 22 jungen, gesunden Probanden und 17 Patienten der andrologischen Ambulanz.

3. 3. Qualitätsansprüche an die Ejakulate

Die Mindestanforderungen für die Gruppe gesunder, junger Probanden waren Normozoospermie nach den Kriterien der WHO (WHO-Handbuch 1993):

Zahl der Spermien $> 20 \times 10^6/\text{ml}$, $> 30\%$ normal geformt, $> 50\%$ Globalmotilität = WHO A+B:

| | | | |
|-------|--|---|--------------------------|
| WHO A | progressiv motil (norm. $> 25\%$) | } | Globalmotilität $> 50\%$ |
| WHO B | mäßig motil (norm. mit A zusammen 50%) | | |
| WHO C | lokal motil | | |
| WHO D | immotil | | |

Ejakulatproben der Patientengruppe hatten zur Voraussetzung, nach Aufbereitung mindestens zwei Milliliter Volumen aufzuweisen. Gleiches galt für die Gruppe der vasktomierten Männer. Die Basis der andrologischen Diagnostik stellt die manuelle Bestimmung der klassischen Ejakulatparameter unter dem Mikroskop dar. Hierzu gehören die Spermatozoenparameter Aussehen, Volumen, Konsistenz, pH-Wert, Konzentration und Motilität, einschließlich der progressiven Beweglichkeit. Die Standardspermaanalyse ermittelt die Spermatozoenkonzentration in einer Zählkammer und gibt die Spermatozoenkonzentration in 10^6 Zellen pro Milliliter sowie die Motilität nach den WHO-Parametern von 1999 an. Hierzu sollten mindestens 200 Spermatozoen, in mehreren definierten Gesichtsfeldern wie folgt beurteilt werden, um die WHO-Kriterien für die Motilität zu erfüllen:

3. 4. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Die Ejakulatgewinnung erfolgte nach einer Karenzzeit von vier Tagen durch Masturbation. Die Ejakulate wurden in Polypropylenbechern (100ml, 76 x 60mm; Sarstedt, Nürnberg, FRG) abgegeben. Die Ejakulate der gesunden Probanden wurden nach einer Verflüssigungszeit von 30 Minuten bei 37°C nach den WHO-Kriterien von 1999 untersucht und Spermio gramme erstellt. Die Auswertung der Ejakulate der beiden Patientengruppen wurde freundlicherweise von den entsprechenden Laboratorien zur Verfügung gestellt, sodass hier keine zusätzliche Verzögerung auftrat. Nach Resuspension der Proben von Gruppe 1, wurden jeweils $10\ \mu\text{l}$ Ejakulat bei 20facher Vergrößerung nativ in einer Zählkammer untersucht. Aussagen über Konzentration (Mio./ μl), Morphologie und Motilität (%) wurden festgehalten. Um den größten Anteil immotiler Spermatozoen zu entfernen, erfolgte die Glaswollfiltration als Aufarbeitsverfahren.

3. 5. Glaswollfiltration

Das Prinzip der Glaswollfiltration beruht auf folgenden Feststellungen: Vitale und progressive Spermatozoen passieren den Glaswollfilter und sammeln sich im Filtrat, während immotile, schlecht motile Spermatozoen sowie andere feste Bestandteile des Ejakulats wie Rundzellen, zurückgehalten werden, indem sie sich in den Glaswollfasern festsetzen (*Sanchez et al., 1996; Henkel & Schill, 1998*).

Die Glaswollfilter (Sperm-Fertil[®], Mello Ltd, Greifenstein, Deutschland) wurden mit vorgewärmten HTF-1%HSA-Medium (*Quinn et al. 1985*), unter Zusatz von HSA (Temperatur: 37°C) vorgewaschen und anschließend in Reagenzgläsern aufgehängt und mit 2ml Nativejakulat beschickt. Bei Ejakulaten mit einer Spermatozoendichte über 40 Mill./ml wurden die Proben 1:2 mit HTF-1%HSA verdünnt, um ein Verstopfen der Glaswollfilter vorzubeugen.

3. 6. Isolierung der Spermatozoen aus dem Seminalplasma

Um die physiologische Trennung der Spermatozoen vom Seminalplasma bei der Cervixpassage zu simulieren, wurden die Spermatozoen gewaschen. Die Trennung vom Seminalplasma dient der Entfernung von Dekapazitationsfaktoren und befähigt die Spermatozoen zur Kapazitation und anschließenden Akrosomreaktion (AR). Diese so genannten „Waschschritte“ sollten nicht willkürlich oft wiederholt werden, da das „Waschen“ der Spermatozoen die Qualität und Vitalität der Spermatozoen negativ beeinflussen kann (*Makler et al., 1981*). Die glaswollfiltrierte Probe wurde im Verhältnis 1:3 mit HTF-1%HSA-Medium gemischt und 10 Minuten bei 400xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Intensives und zu langes Zentrifugieren kann die Motilität humaner Spermatozoen negativ beeinflussen und sogar das Absterben der Spermatozoen provozieren (*Makler et al., 1981*), so dass die einzelnen Schritte und Zeitvorgaben genau eingehalten werden müssen. Die im Pellet gesammelten und vom Seminalplasma befreiten Spermatozoen wurden in HTF-1%HSA-Medium resuspendiert und auf eine Dichte von 20 Mill./ml (=Standardkonzentration) eingestellt. Abschließend wurde eine erneute Kontrolle von Spermatozoendichte und Motilität mittels Auszählung bei 20facher Vergrößerung unter dem Mikroskop durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung von Spermatozoenzahl, -motilität und verschiedenen Geschwindigkeitsparametern mittels CASA (Computer-Assisted-Spermmotion-Analyzer).

3. 7. Immunoblot (Western-Blot) an humanen Spermatozoen zum Nachweis von AT1 und AT2

Ein Immunoblot wurde nach einem festgelegten Schema durchgeführt um zusätzliche, qualitative Hinweise auf das Vorhandensein der AII Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 auf humanen Spermatozoen zu finden (Abb. 13).

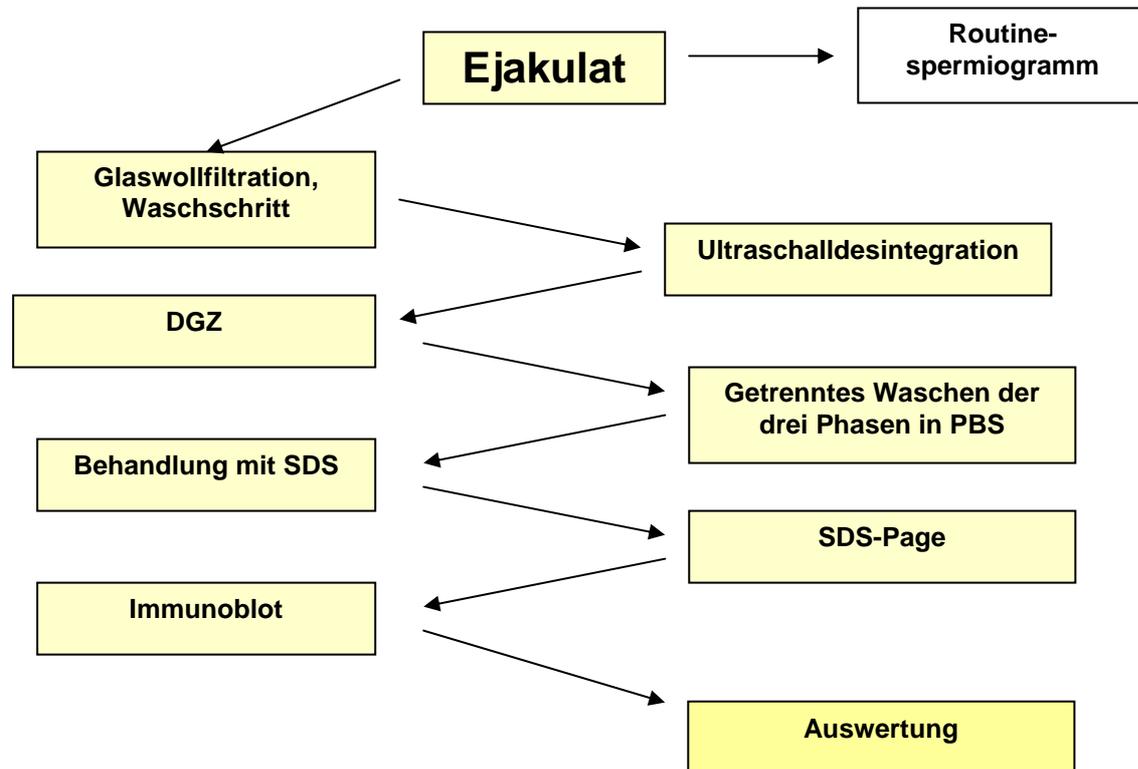


Abb. 9: Kurzprotokoll Western-Blot: Nach einem Routinespermiogramm wird das Ejakulat glaswollfiltriert, gewaschen und nach Ultraschalldesintegration einer Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) unterzogen. Nach Trennung der entstehenden drei Phasen, werden diese in einer SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)-Page aufbereitet und mittels Immunoblot auf die gesuchten Antigene AT1 und ATII hin untersucht.

3. 7. 1. Aufbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

Von verflüssigtem, humanem Ejakulat gesunder Probanden mit Normozoospermie wurde ein Routinespermiogramm erstellt. Anschließend wurden die beweglichen Spermatozoen durch Glaswollfiltration separiert. Das Filtrat wurde in PBS resuspendiert und zwei Mal in PBS gewaschen. Hierbei wurde das Filtrat mit fünf Milliliter PBS-Lösung vermischt, und bei 400xg zentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss wieder resuspendiert. Die Spermatozoenköpfe wurden mit einem Bandelin Ultraschall-Desintegrator (Sonopuls HD 60, Deutschland) von den Spermatozoengeißeln abgetrennt. Die Beschallung erfolgte 3 x 10 Sekunden bei 25 Hz, zwischen den Salven erfolgte eine Pause von 30 Sekunden, wobei die

Probe auf Eis gekühlt wurde. Mittels *Dichtegradientenzentrifugation* (DGZ) wurden die abgetrennten Spermatozoenköpfe von den Geißeln getrennt. Hierzu wurden eine 40%ige Percollphase mit einer 90%igen Percollphase unterschichtet und die beschallte Spermatozoensuspension vorsichtig aufgetragen. Anschließend wurde 20 Minuten lang bei 300g (ohne Bremse) zentrifugiert. Das Resultat waren drei Phasen, die sich unter dem Mikroskop herausstellten als:

1. Spermatozoenköpfe (unten)
2. Flagellae (Mitte)
3. Probenflüssigkeit bzw. Überstand (oben).

Die drei Phasen wurden isoliert und getrennt in PBS gewaschen. Die entstandenen Pellets wurden in je 2 ml Probenpuffer (Probenpuffer: 2 % SDS (*Sodium Dodecyl Sulfat*=*Natriumdodecylsulfat*), 0,5% DTT, 10 % Glycerin, angefärbt mit Bromphenol) aufgelöst.

SDS ist ein anionisches Detergens, das die Eigenladung von Proteinen so effektiv überdeckt, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen.

Im Überschuss von SDS wurde die Probe für 6 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine, durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und Streckung der Moleküle, aufzulösen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die so behandelte Probe bei 4°C aufbewahrt, mindestens aber so lange, bis die Probe abgekühlt war.

3. 7. 2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung zu untersuchender Proteingemische wurde eine *diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli* (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Zur optimalen Parzellierung der Proteinsuspension wurden 10%ige Trenngele und 6%ige Sammelgele eingesetzt.

Zwei mit Methanol gereinigte und entfettete Glasplatten (12 x 15 cm und 10 x 15 cm) einer Mini-Protean Gel-Elektrophoresekammer wurden in die entsprechende Halterung eingelegt und nach Einsetzen der 0,75 mm starken Distanzstäbe, eingespannt.

Um ein Auslaufen zu verhindern, wurde diese Halterung in einem Ständer mit Gummiboden fixiert, wobei darauf geachtet wurde, dass der untere Rand beider Glasplatten eben und deckungsgleich sein sollte. In den Spalt zwischen den Glasplatten wurde anschließend das flüssige Trenngel, mittels einer Glaspipette eingefüllt und mit A. dest. überschichtet. Dies verhinderte ein Austrocknen des Gels und führte zusätzlich zu einer glatten und ebenen Geloberkante. Nach 45 Minuten war das Trenngel polymerisiert, der Polymerisationsgrad wurde am Polyacrylamidüberstand des Ansatzes beurteilt und das Wasser mit

herkömmlichem Filterpapier abgezogen. Anschließend erfolgte das Auftragen des Sammelgels, dem unmittelbar im Anschluss Gelkämme mit 10 Geltaschen und 0,75 mm Stärke aufgesetzt wurden. Nach der Polymerisation, die etwa 30 Minuten in Anspruch nahm, wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Gelhalterung mit dem Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt oder bis zum Zeitpunkt des Auftragens der Proben bei 4°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Die Aufbewahrungszeit wurde jedoch so kurz wie möglich gehalten, um den Gradienten zwischen Sammel- und Trenngel nicht zu zerstören. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer gefüllt, das Gelkompartiment wurde dabei so aufgefüllt, dass stets das Gel mit Laufpuffer überschichtet war, um den elektrochemischen Gradienten zu gewährleisten.

Da bei dieser Methode über bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen herrscht, kann man Standards verwenden, die zur Ermittlung der Molekulargewichte der aufgetrennten Peptide dienen. Für die hier beschriebene Fragestellung wurde ein handelsüblicher Gelelektrophoresemarker der Firma Santa Cruz (Cruz Marker MW Standards sc-2035) mit 132kDa, 90 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 23 kDa und ein LMW-Marker (Low Molecular Weight) der Firma Santa Cruz (prestained MW Standards sc-2361) mit 97 kD, 66 kD, 44 kD, 29 kD, 17 kD und 14 kD verwendet. Gebrauchsfertig sind die Standards nach Zugabe des entsprechenden Volumens Probenpuffer und dem Erhitzen gemäß Behandlung der Probe. Die mit Laufpuffer (25 mM Tris, 40 mM Amino-n-capronsäure, in 20% Methanol bei einem pH von 9,4) bedeckten Geltaschen wurden vor dem Versuch mittels einer dünnen Kanüle und einer Spritze mit A. dest. gereinigt.

Das vorbereitete Gel wurde mit den entsprechenden LMW-Markern und Proben (Spermatozoenköpfe, Flagellae oder Überstand, sowie den Positivkontrollen (KNRK-Whole Cell Lysate, sc2214)) beschickt.

Die Kammer wurde mit dem zugehörigen Deckel verschlossen und nach dem Anschluss an ein Elektrophoresegerät der Vorgang gestartet. Hierzu wurde eine konstante Spannung von 100 V pro Gel, bei einer Stromstärke von 30mA angelegt (Stromquelle: Bio-Rad, Model 1000/500 Power Supply). Nach etwa 3 ½ Stunden erreichte die Lauffront den unteren Glasrand, das Gel wurde entnommen und die aufgetrennten Proteine mittels Westernblot auf eine ImmobilonTM-Membran transferiert.

3. 7. 3. Immunoblot

Ein Immunoblot wurde zum Nachweis der AII- Rezeptoren in den gelelektrophoretisch aufgetrennten Spermatozoenproteinen durchgeführt. Hierzu wurden die kommerziellen

Primärantikörper AT1 (306) (sc579) und AT2 C18 (sc-7420), (beide Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), HRP-konjugierte (HRP= *Horse Raddish Peroxidase*) Sekundärantikörper (sc 2350Bov.agoat IgG HRP, bzw. sc2357 mouse anti rabbit IgG HRP, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) und ECLTM (Amersham Pharmacia Biotech, UK) verwendet.

3. 7. 3. 1. Westernblot

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen aufgetrennten Proteine wurden im Semi – Dry – Verfahren auf eine ImmobilonTM PVDF-Membran der Firma Millipore (Millipore Immobilon NC Pure, USA), elektrotransferiert. (*Towbin et al., 1979*).

3. 7. 3. 2. Elektrotransfer

Das Gel wurde der Kammer entnommen und anschließend das Sammelgel vom Trenngel getrennt. Das Trenngel wurde kurz im Kathodenpuffer platziert, die Membran in den Anodenpuffer. Auf die Anode der Apparatur wurden drei Lagen eines Filterpapiers gelegt, das zuvor in konzentriertem Anodenpuffer getränkt wurde. Darauf wurden drei Lagen anodenpuffergetränktes Filterpapier gegeben, darüber die anodenpufferbefeuchtete ImmobilonTM PVDF Membran. Diese wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und anschließend mit dem kathodenpuffergetränktem Gel, blasenfrei bedeckt. Dieser Stapel wurde mit kathodenpuffergetränktem Filterpapier überdeckt (Blotting- Apparatur: Biometra).

Nach 1 ½ h wurde die Membran entnommen und mit einer 2%igen Panceau S-Lösung angefärbt. Ein Transfer der Proteine aus dem Gel auf die ImmobilonTM PVDF Membran konnte nach Auswaschen von überschüssigem Farbstoff mit A. dest., durch die sich ergebende Rotfärbung der Proteinbanden auf der ImmobilonTM PVDF Membran nachgewiesen werden. Weiterhin wurde eine Coomassie-Blau-Färbung des Gels durchgeführt, um sicherzustellen, dass sämtliche Proteine vom Gel auf die ImmobilonTM PVDF Membran überführt wurden. Hierzu wurden die Gele für 30 Minuten in eine 0,25%ige Coomassie-Blau-Färbelösung gelegt. Nach anschließender Entfärbung mit Entfärbelösung über Nacht waren, nur sehr geringgradig blau angefärbte Proteinbanden erkennbar, was einen nahezu vollständigen Transfer der Proteine verdeutlichte.

3. 7. 3. 3. Immunbiochemische Proteinidentifizierung

Die Immobilon™ PVDF Membran wurde beschriftet und in Roti-Block (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) für 3x10 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Anschließend wurde die Membran auf eine ethanolgereinigte Plastikschale gelegt. Der Bereich der Negativkontrollen wurde abgeschnitten und nur mit Roti-Block ohne Primärantikörper inkubiert. Diese Spuren dienten als Negativkontrolle. Die restlichen Spuren wurden mit einer Primärantikörperverdünnung von 1:1000 (in Rotiblock™) überschichtet (AT1 (306) und AT2 C18, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg). Die Schale wurde abgedeckt, über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Immobilon™ PVDF Membran 3x15 Minuten in Waschpuffer gelegt und auf einem Schwenker während des Vorganges gleichmäßig bewegt.

Es folgte die einstündige Inkubation bei 4°C mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (sc 2350 Bov.agoat IgG HRP, bzw. sc2357 mouse anti rabbit IgG HRP, beide Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), die zuvor ebenfalls 1:1000 in Rotiblock™ verdünnt worden waren. Dieser Schritt wurde auch für den Bereich der Negativkontrollen durchgeführt. Anschließend folgte erneutes Waschen in Waschpuffer für 3x15 Minuten. Danach wurde auf die zwei Teile der Immobilon™ PVDF Membran ECL™ (Enhanced Chemiluminescence) nach Herstellerangaben aufgetragen (Amersham Pharmacia Biotech, UK) und nach einer Minute wieder abgekippt. Die Membran wurde sodann in eine lichtdichte Röntgenkassette gelegt, die zuvor mit zwei übereinander liegenden, ethanolgereinigten Folien versehen wurde. Zwischen die beiden Folien wurden die beiden Teile der Immobilon™ PVDF Membran gelegt und die Kassette lichtdicht verschlossen.

Die Entwicklung der Bilder erfolgte in einer Dunkelkammer. Ein Röntgenfilm (Fuji RX New, 18 x 24cm, Bechthold GmbH Röntgenhandel, Kelkheim) wurde in die Röntgenkassette gelegt. Nach einer Belichtungszeit von drei Minuten wurde der Film entnommen in den Entwickler getaucht und anschließend in Fixierer getaucht. Danach wurde der Film in Wasser gewaschen. Die nassen Filme wurden zum Trocknen aufgehängt, anschließend bei Tageslicht betrachtet. Membranen und Röntgenfilme wurden digital und physikalisch archiviert.

3. 8. Immunzytochemie an humanen Spermatozoen

Die Immunzytochemie an humanen Spermatozoen wurde durchgeführt, um das Vorhandensein und die Verteilung von AII Rezeptoren des Typs 1 und 2 und von membrangebundenen AI und II auf humanen Spermatozoen nachzuweisen. Außerdem wurde

die relative Verteilung der Rezeptortypen zueinander und in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen (Temperatur, Art der Fixierung, Fixans) und dem Vorhandensein des Akrosoms untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte fstandardisiert (Abb. 14).

3. 8. 1. Anfertigung der Spermatozoenausstriche

Verflüssigtes Ejakulat wurde 1x in PBS (Phosphate Buffered Salina, Oxoid LTD, England) gewaschen. Anschließend erfolgte die Glaswollfiltration (Glaswollfilter, Sperm-Fertil, Mello Ltd, Greifenstein). Daraufhin wurde die Probe in PBS gewaschen und auf 50 Millionen Spermatozoen pro Milliliter eingestellt. 20µl der Probe wurden gleichmäßig und blasenfrei auf Super-Frost-Objektträgern (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) ausgestrichen. Hierzu wurde ein Ejakulat- oder Probentropfen auf einem sauberen Objektträger aufgetragen. Mittels eines Deckgläschens wurde dieser Tropfen in einer ziehenden Bewegung (so genanntes "feathering") gleichmäßig verteilt.

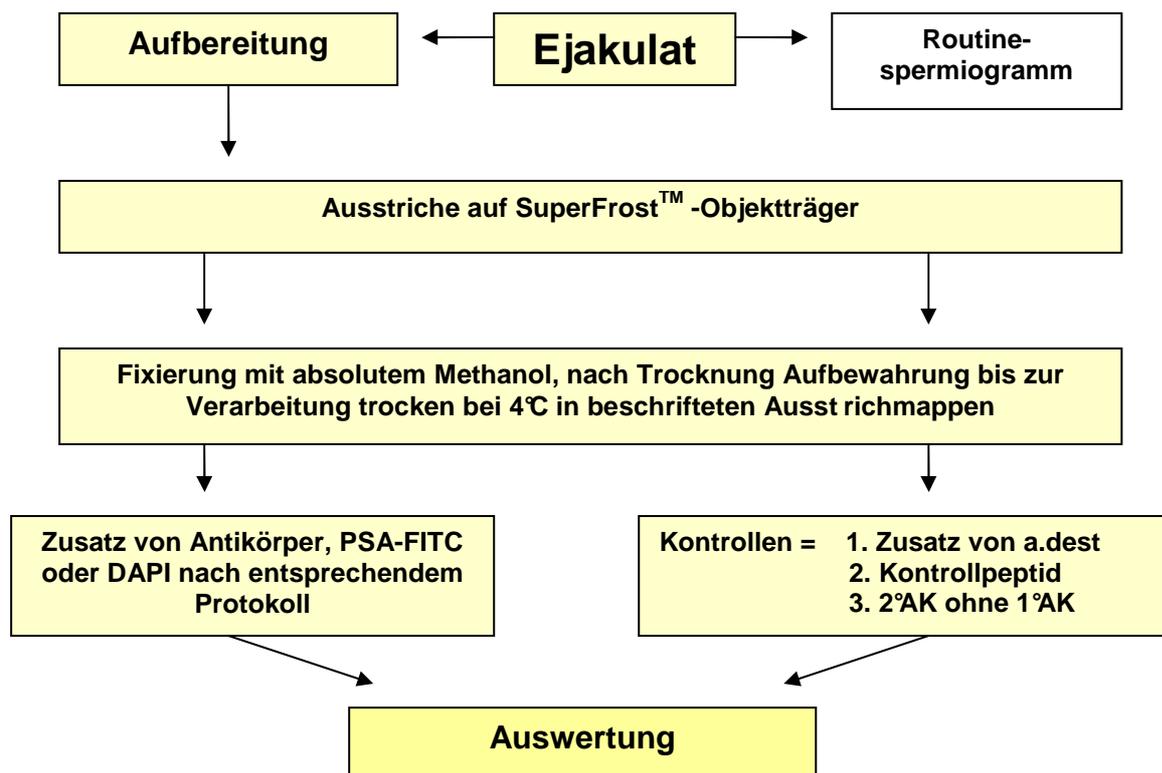


Abb. 10: Kurzprotokoll für die Immunzytochemie: Nach einem Routinespermiogramm und entsprechender Aufbereitung wurden die verschiedenen Proben mit A.dest, Kontrollpeptid, 2°Antikörper (AK) mit und ohne 1°-AK inkubiert. Nach Fixierung mit absolutem Methanol erfolgte die Aufbewahrung bei 4°C bis zur Auswertung am Mikroskop.

Nach Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Ausstriche mit absolutem Methanol für 30 Sekunden fixiert. Nach dem Trocknen wurden auf den Objektträger mit einem PAP-Pen (PAP-Pen, Immunotech, Coulter Company) zirkuläre Areale markiert, um ein Auslaufen zu verhindern. Die Ausstriche konnten so für mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert werden.

3. 8. 2. Durchführung der Immunzytochemie

Folgende Primärantikörper/Peptide wurden eingesetzt (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg):

- AT2 (C18): Epitop gegen das carboxyterminale Ende des humanen AT2
- AT2 (N19): Epitop gegen das aminoternale Ende des humanen AT2
- AI/II (N10) Peptide: Kontrollantigen
- AT1 (306): Epitop gegen die Aminosäuren 306 bis 359 des humanen AT1
- AT1 N10: Epitop gegen das aminoternale Ende des humanen AT1

Folgende Sekundärantikörper wurden eingesetzt:

- Mouse-anti-rabbit B (Spacer), biotin-SP-conjugated AffiniPure Rabbit-anti Mouse IgG 315-065-045 (lot: 27810 Dianova, Hamburg)
- Cy3 von Dianova (Hamburg)

Die Beurteilung des akrosomalen Status der Spermatozoen wurde mit PSA-FITC (Pisum Sativum Agglutininum-Fluoresceinisothiocyanat, Sigma, Steinheim) bestimmt (*Cummins et al., 1991, Köhn et al., 1997*). Dazu wurden 150µl des PSA-FITC in einer Konzentration von 50µg/ml auf die fixierten und getrockneten Proben aufgetragen und nach 30 Minuten, überschüssiges Reagenz durch einen Waschvorgang in PBS entfernt. Akrosomreagierte Spermatozoen zeigten dabei keine Anfärbung durch das PSA-FITC im Bereich des Akrosoms, wohingegen intakte Akrosome durch die Markierung mit PSA-FITC im vorderen Kopfbereich intensiv gelb fluoreszierten (*Cummins et al., 1991*).

Die DNA wurde mit dem Kernmarker DAPI (= 4, 6-diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), markiert. Die Stammlösung wurde hierzu 1:100 verdünnt und die Objektträger für 15 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschritt zum Entfernen überschüssigen Farbstoffes. Die Objektträger wurden mit Propylgallat blasenfrei und gleichmäßig überschichtet und mit Deckgläschen bedeckt. Die

Beurteilung der Ergebnisse erfolgte mit dem Leitz-Fluoreszenz-Mikroskop DM-RD/RE (400x Vergrößerung) (Leitz GmbH, Wetzlar), und einem Fujichrome SensiAII 400- Film (Bechthold GmbH Röntgenhandel, Kelkheim).

3. 8. 2. 1. Zweifachmarkierung mit einem Antikörper und einem DNA-Farbstoff (DAPI)

Mittels kommerzieller Antikörper wurde nach AII Typ 1 und 2 Rezeptoren, sowie Spuren von AI und II auf humanen Spermatozoen gesucht und deren Lokalisation auf dem Spermatozoon bestimmt. Mehrfachmarkierungen wurden auf einem Bild dargestellt in dem man den Filmvorschub deaktiviert und dieselbe Stelle des Films mehrfach mit verschiedenen Filtern, die abhängig von dem Fluoreszenzmarker sind, belichtet. Hierbei mussten Bewegungen des Objektträgers unbedingt vermieden werden, da es sonst zu Artefakten auf dem Film gekommen wäre.

In einer feuchten Kammer wurde die erforderliche Anzahl an Ausstrichen ausgelegt. Die Objektträger wurden für 10 Minuten mit TBS (Tris Buffered Salina= Tris 2,4g; NaCl 9,0g; NaN₃; 1,3g; Tween 20 1,0ml, BSA 1,0g; ph 8,2; Merck, Darmstadt) überschichtet. Anschließend wurde das TBS entfernt und der jeweilige Primärantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Ludolf-Krehl-Straße 33, 69120 Heidelberg) in einer Verdünnung von 1: 100 aufgetragen. Bei der Negativkontrolle wurde dieser Schritt nicht berücksichtigt. Die Inkubation erfolgt in der feuchten Kammer über Nacht bei 4°C. Das Kontrollpeptid (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg) wurde zu gleichen Teilen mit dem getesteten Antikörper gemischt und eine Stunde lang inkubiert. Danach wurde der Ansatz 5 Minuten lang bei 12000xg zentrifugiert und der Überstand wie der Primärantikörper behandelt.

Ein Versuch enthielt somit drei Objektträger bei Testung eines Antikörpers, je weiterem getesteten Antikörper wurde diese Palette um zwei Objektträger (Kontrollpeptid und Antikörper) erweitert.

Nach der Inkubation wurden die Objektträger abgekippt und, als Waschschrift, TBS für 10 Minuten aufgetragen. Im Anschluss wurde dieses wieder entfernt und ein biotinylierter Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1: 500 aufgetragen. Die Objektträger wurden für eine Stunde inkubiert und der Waschschrift mit TBS für 10 Minuten wiederholt. Im Anschluss wurde ein strept-avidin gekoppelter CY-3 Antikörper (Dianova, Hamburg) aufgetragen, die Inkubation erfolgte für 30 Minuten. Danach wurde wiederum ein Waschschrift mit TBS durchgeführt.

Im Anschluss wurde DAPI (= 4, 6-diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), zur Identifizierung des DNA-Materials, aufgetragen. Dieser Schritt ermöglichte es, die Antikörpermarkierungen in Relation zum DNA-Material und somit zum Kopf des Spermatozoons zu setzen (Verdünnung der Stammlösung: 1:100).

Nach 10 Minuten wurde dieses entfernt und ein abschließender Waschschrift durchgeführt. Die so behandelten Objektträger wurden anschließend mit Propylgallat (Glycerin + PBS zu gleichen Teilen, 3, 4, 5-Trihydroxybenzoatpropylester) blasenfrei und gleichmäßig überschichtet. Hierbei wurde ein Tropfen Propylgallat auf den Objektträger getropft und ein Deckglas aufgelegt.

Die Auswertung der Immunreaktion erfolgte unter einem Leitz-Fluoreszenz-Mikroskop DM-RD/RE (400x Vergrößerung) (LeitzGmbH, Wetzlar).

3. 8. 2. 2. Dreifachmarkierung mit einem Rezeptorantikörper, PSA-FITC und DAPI

Prinzipiell war der Vorgang der gleiche. Es wurde lediglich ein Färbeschritt vorangestellt. Hierzu wurde PSA-FITC (Pisum Sativum Agglutininum, FITC-gekoppelt, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf) auf die methanolfixierten und trockenen Objektträger aufgetragen, um die Akrosomkappe zu markieren, der weitere Verlauf war der gleiche wie unter 4. 6. 2. 1. Hierbei konnte differenziert werden zwischen kapazitierten, akrosom- und nicht akrosomreagierten Spermatozoen.

3. 8. 2. 3. Dreifachmarkierung mit zwei verschiedenen, gegen unterschiedliche Zielproteine, gerichtete Antikörper und DAPI

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um gleichzeitig den AT1- und den AT2-Antikörper in einer Probe darzustellen und die Relation und Verteilung zueinander und zum Spermatozoenkopf besser beurteilen zu können.

Das Prinzip dieser Variante unterschied sich nicht wesentlich von der bisher beschriebenen Methode. Die Immunzytochemie wurde für beide Antikörper auf demselben Objektträger nacheinander durchgeführt, wobei DAPI erst nach der Markierung des zweiten Antikörpers aufgetragen wurde.

3. 8. 2. 4. Immunzytochemie nach Kapazitation

Um die Abhängigkeit der Repräsentation, der AII Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 im Bereich der akrosomalen Region und der Geißel von den Inkubationsverhältnissen zu untersuchen, wurde die akrosomale Reaktion im folgenden Versuch mittels Calcium Ionophor A23187 (*De Jonge et al., 1989, Byrd et al., 1989, Köhn et al., 1997*) induziert und mit verschiedenen alternativen Inkubationsvarianten verglichen.

3. 8. 2. 4. 1. Calcium Ionophor A23187

Zur Herstellung des gebrauchsfertigen Calcium Ionophor wurden 10 mg Calcium Ionophor A23187 (Boehringer Mannheim Cal NO. 414603, Deutschland) in 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und zu je 10 µl in Eppendorf-Cups aliquotiert. Diese wurden bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden 10 µl dieser Lösung in 90 µl HTF Medium gegeben und 5,5 ml der entstandenen Lösung zu 500 µl Spermatozoensuspension zugesetzt. Die Endkonzentration des Ionophor A23187 betrug 10 mM.

3. 8. 2. 4. 2. Herstellung des Dimethylsulfoxid (DMSO)

Zur Herstellung des gebrauchsfertigen DMSO wurden 10 µl DMSO (Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) in 90 µl HTF Medium gegeben. 5,5 ml dieser Lösung wurden zu 500 µl Spermatozoensuspension zugesetzt. Die Endkonzentration der Lösung betrug 0,1%.

3. 8. 2. 4. 3. Versuchsablauf

Für jedes Ejakulat wurde eine Routinespermiogramm erstellt. Anschließend wurde das Ejakulat in HTF-1%HSA gewaschen, glaswollfiltriert und abermals gewaschen. Das Pellet wurde in 2 ml HTF-1%HSA resuspendiert und die Probe in vier nummerierte Reagenzgläser aufgeteilt. Reagenzglas 1 wurde drei Stunden bei Raumtemperatur belassen, Reagenzglas 2 bei 37° C. Reagenzglas drei wurde 1 x in PBS gewaschen und unmittelbar nach der Resuspendierung wurden Ausstriche angefertigt. Reagenzglas 4 wurde nach zwei Stunden und 45 Minuten bei 37° C mit Calcium Ionophor für 15 Minuten behandelt. Anschließend wurden die Proben 1, 2 und 4 in PBS gewaschen und von den Proben Ausstriche angefertigt. Die Ausstriche wurden einer Dreifachmarkierung unterzogen und die markierten Spermatozoen unter dem Mikroskop als Anteil von 100 ausgezählt. Die prozentualen Anteile akrosomreagerter Spermatozoen in den verschiedenen Proben wurden anschließend miteinander verglichen.

3. 9. ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbend Essay*)

Mittels ELISA wurde die Konzentration von AII im Seminalplasma junger gesunder Männer, Vasektomiepatienten und Patienten der andrologischen Ambulanz der Hautklinik des Universitätsklinikums Gießen bestimmt. Die Gruppe vasektomierter Patienten sollte Hinweise auf den Ursprungsort von AII liefern (Siehe Kapitel 5. 2).

3. 9. 1. Prinzip des ELISA

3. 9. 1. 1. Einführung

Der Begriff ELISA steht für "Enzyme Linked Immuno sorbend assay". Oft wird er auch nur EIA (Enzyme Immunoassay) abgekürzt. Es ist eine In-vitro-Methode zur quantitativen Untersuchung antigener Substanzen. Mit Einführung dieser Methode wurde eine wesentliche Vereinfachung gegenüber den bis dahin gebräuchlichen RIA's (Radio Immuno Assay) erzielt, bei denen das Prinzip zwar das gleiche war, der Umgang mit radioaktivem Material immer aber auch ein Risiko und arbeitstechnisches Problem darstellte, abgesehen davon, dass Radioisotope eine Halbwertszeit besitzen, die den Bereich zuverlässiger Messungen zusätzlich einschränken. Im RIA ist die Detektionsmethode die ausgehende Strahlungsintensität im Vergleich zu Standards bekannter Strahlungsintensität, im ELISA ist es eine einfache Farbreaktion, die mit einem Fotometer gemessen werden kann.

3. 9. 1. 2. Methode

Unterschieden werden müssen der ELISA vom kompetitiven ELISA. Der ELISA ist ein heterogener Enzym-Immunoassay:

Die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Antikörper sind an eine Trägersubstanz gebunden und bilden nach Inkubation mit der Probe Immunkomplexe mit den Antigenen. An diese Immunkomplexe lagern sich daraufhin zugegebene enzymmarkierte Anti-Antikörper an (Sandwichmethode). Ein zugegebenes chromogenes Substrat im Reaktionsansatz macht die Antigen-Antikörper-Komplexe schließlich sichtbar. Die Ergebnisse werden mit mitgeführten Standards verglichen. Je höher der Gehalt gesuchter Substanz, desto stärker die Farbreaktion. Bei diesem System ist die Fehlerquote allerdings höher als bei folgender Variante:

- Der kompetitive Enzymimmunoassay, wie er auch in dieser Arbeit verwendet wurde, weist eine geringere Fehlerquote auf. Hier ist der Gehalt gesuchter Substanz umgekehrt proportional der Farbreaktion, da die Detektionssubstanz mit der gesuchten Substanz um Bindungsstellen im Behälter konkurriert. (Abb. 15).

An Hand des in dieser Arbeit verwendeten kompetitiven ELISA soll diese Methode noch etwas genauer erklärt werden:

Peptidantikörper, biotinylierte Peptide und nicht biotinylierte Peptide (entweder Standards oder unbekannte Probe) werden in ein „well“ (=Vertiefungen der Mikrotiterplatte) pipettiert und gemischt. Die Anti-Peptid-Antikörper binden an die vorbehandelte Gefäßwand der Mikrotiterplatte. Das biotinylierte Peptid konkurriert mit den Standardpeptiden oder den Peptiden in der unbekannten Probe um die Antikörperbindungsstellen (Schritt 1). Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden werden ungebundene biotinylierte Peptide abgespült und es wurde streptavidin-conjugiertes HRP = SA-HRP (Horseradish Peroxidase: Meerrettichperoxidase) hinzugegeben und in einem weiteren Inkubationsschritt von 60 Minuten die Bindung an die immobilisierten Komplexe aus Primärantikörper und biotinyliertem Peptid erlaubt (Schritt 2). Überschüssige SA-HRP wurde sodann abgewaschen und TMB (3,3',5',5'-Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid) zugesetzt, welches mit der SA-HRP reagiert (Schritt 3). Der Grad der Färbung im „well“ ist abhängig von der Anzahl gebundener biotinylierter Peptide, die an die immobilisierten Antikörper gebunden sind. Je mehr nicht biotinyliertes Peptid in der Probe ist, desto weniger biotinyliertes Peptid kann an den primären Antikörper binden und desto weniger stark fällt die Farbreaktion aus (=kompetitiver Immunoassay).

Auf der folgenden Seite wird das Prinzip des ELISA noch einmal in grafischer Form zusammengefasst (Abb. 15).

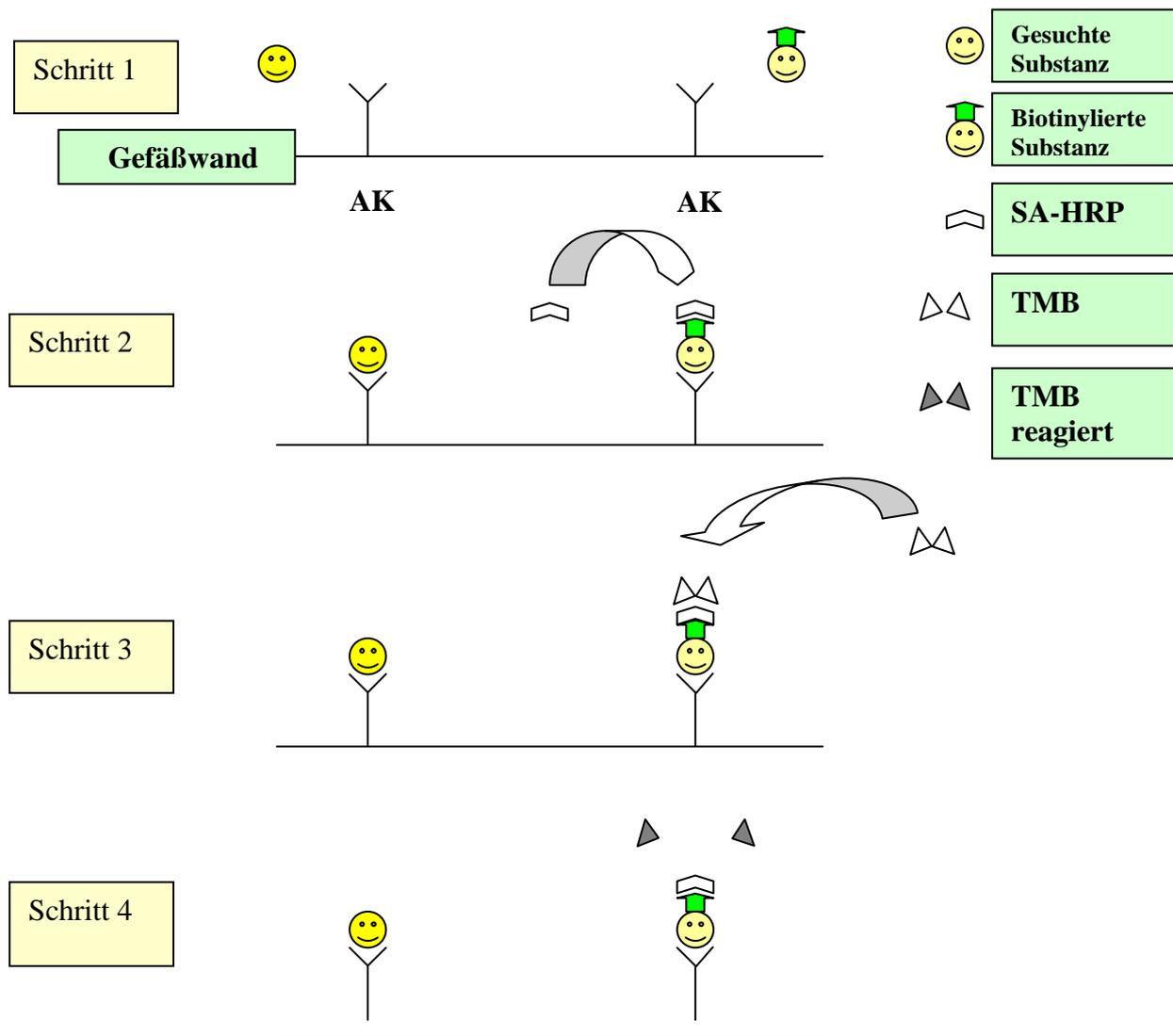


Abb. 11: Schematische Darstellung eines kompetitiven ELISA: Die gesuchte Substanz konkurriert mit einer definierten Menge biotinylierter Substanz um die Antikörperbindungsstellen. Nur die biotinylierte Substanz bindet SA-HRP (Streptavidin-Horse-Radish-Peroxidase). SA-HRP reagiert mit TMB (3,3',5',5'-Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid) unter Emission von Licht, welches in einem Photometer gemessen werden kann. Je mehr biotinylierter Substanz die Antikörper gebunden hat (=je weniger gesuchte Substanz in der Probe), desto intensiver ist die Lichtemission (=Farbreaktion). 3. 9. 2. Versuchsdurchführung

Die Ejakulate von freiwilligen Probanden, vasktomierten Männern und Patienten der andrologischen Ambulanz der Hautklinik des Universitätsklinikums Gießen wurden nach einer Verflüssigungszeit von maximal 10 Minuten bei 300g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in Glasküvetten bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gesammelt (Abb. 16). Es

wurden Proben von bekannten Probanden und andrologische Patienten verwendet um die Zeit bis zur Verarbeitung der Probe und somit Zeit in der AII abgebaut wird, durch Weglassen der Routinediagnostik möglichst zu reduzieren.

Die Proben wurden bei 4°C aufgetaut. Sämtliche Arbeitsschritte sollen bei Raumtemperatur stattfinden, daher sollten die Materialien vor Beginn auf Raumtemperatur gebracht werden.

Primärinterferon, Standardpeptid, biotinyliertes Peptid und SA-HRP wurden nach Gebrauchsanleitung im mitgelieferten Puffer gelöst.

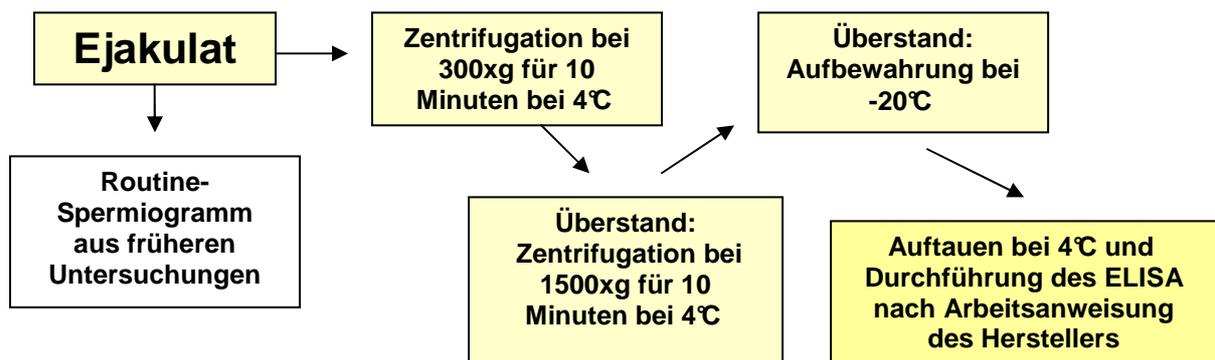


Abb. 12: Kurzprotokoll für die ELISA. Nach Aufbereitung der Ejakulatprobe erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C zunächst bei 300xg für 10Min. Der Überstand wird bei 1500xg abermals für 10Min. zentrifugiert und der daraus hervorgehende Überstand wird in Glasküvetten bei -20°C bis zur Durchführung des ELISA aufbewahrt.

1. Initiation: Die vorbereitete Mikrotiterplatte wurde nach folgendem Schema beschickt:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 1 | 1 | 1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Tabelle 3: Pipettierschema eines herkömmlichen ELISA.

Dunkelgrau: Standardkonzentrationen in Doppelbestimmung (Spalte 1 und 2), wobei A1 und A2 den Nullwert repräsentieren (grau unterlegt). Volumen pro Feld 50µl.

Hellgrau : Proben in Doppelbestimmung (Spalte 1 und 2) Volumen pro Feld: 50µl.

In jedes Feld wurden anschließend 25µl Primärantikörperlösung und 25µl biotinyliertes Standardpeptid gegeben. Danach wurde die Platte mit einer mitgelieferten Folie verschlossen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2. Enzymatische Detektion

Die ELISA-Platte wurde ausgeschüttet und 5 Mal mit Waschpuffer gewaschen.

Von der angefertigten SA-HRP-Lösung wurden 100µl in jedes well gegeben und die Platte wieder mit der Folie verschlossen. Danach wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Platte abgedunkelt wurde. Im Anschluss wurde der Waschvorgang wiederholt und die mitgelieferte TMB-Lösung aufgetragen. Hierzu wurden 100µl der gebrauchsfertigen Lösung in jedes well pipettiert und die Platte abermals abgedeckt inkubiert. Die Inkubationszeit sollte zwischen 30 und 60 Minuten liegen. Der Hersteller empfiehlt jedoch, alle 5 bis 10 Minuten die Farbe zu überprüfen und je nach gewünschter Farbintensität die Reaktion dem nächsten Schritt zu überführen.

Hierbei werden 100µl einer 2N-HCL-Lösung in jedes well pipettiert, um die Reaktion zu stoppen.

3. Auswertung

Der Boden der ELISA-Platte wurde mit 70%igem Ethanol abgewischt und die APS-Folie entfernt. Die Mikrotiterplatte wurde in einem Fotometer (*ELISA Photometer Multiscan MCC/340, Titertek Labsystems, Alabama, USA*) bei einer Wellenlänge von 450nm ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte durch *Herrn Dr. Boedecker* und *Frau Scheibelhut* (*Arbeitsgruppe „Medizinische Statistik“ am Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen*). Es wurde der Median der drei Gruppen ermittelt, diese mit dem Median-Test verglichen und die Variabilität der Werte mit dem Test nach Siegel-Tukey, auf Unterschiede zwischen den Gruppen, untersucht.

3. 10. Motilitätsbestimmung mittels Computergestützter Analysis (CASA)

3. 10. 1 Einführung

CASA (Computer-Assisted-Spermotion-Alyser) steht zur objektiven Beurteilung des Ejakulats seit Mitte der 80er Jahre zur Verfügung (Davis et al., 1989, Vantman et al., 1989). Die CASA ist eine etablierte Untersuchung für die Bewertung von Spermatozoendichte und Funktion, deutliche Abweichung zur manuellen Samenanalyse treten lediglich bei zu hoher und zu niedriger Spermatozoenkonzentration in der Probe auf (Vantman et al., 1989). Diese Technologie basiert auf digitalisierten Spermatozoenbildern, welche über eine Videokamera sichtbar gemacht werden und mittels eines speziellen Computerprogramms analysiert werden (Abb. 17). Die Untersuchungszeiten sind kurz und die Ergebnisse sind weitgehend untersucherunabhängig und somit in hohem Maße objektiv.

Das Prinzip der CASA besteht darin das Bild unter dem Mikroskop mit einem Rechner auszuwerten. Hierzu ist das Mikroskop über eine CCD- Kamera an einen PC angeschlossen, der mit der entsprechenden Soft- und Hardware ausgestattet ist.

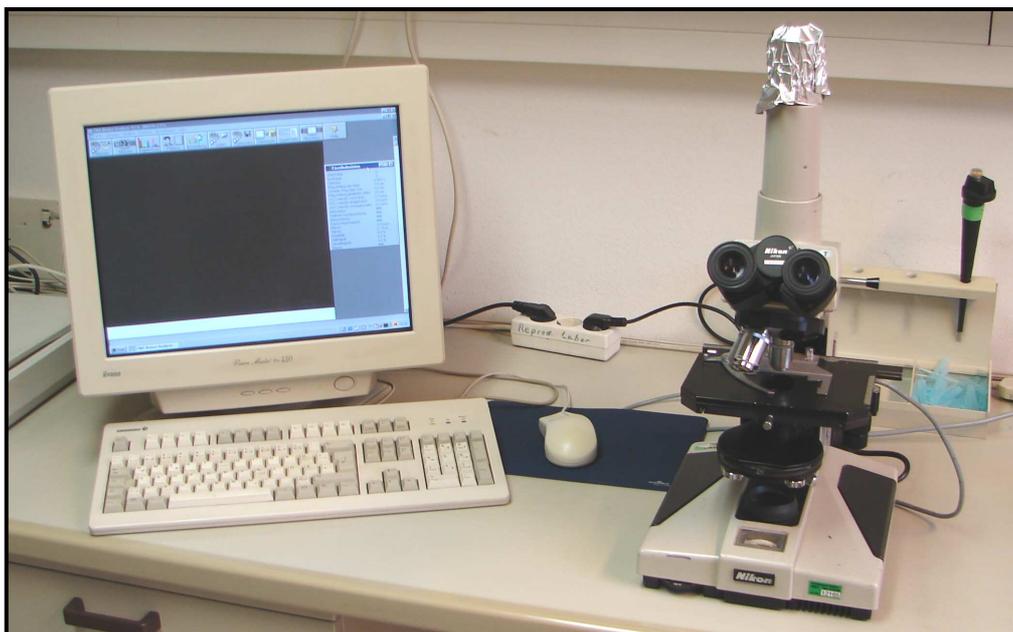


Abb. 13: Arbeitsplatz der verwendeten CASA-Einrichtung (SM-CMA, andrologisches Labor, Hautklinik des Universitätsklinikums Giessen/Marburg).

Das CASA-System ist eine Weiterentwicklung der Multiple Exposure Photography (MEP), die ab Ende der 70er Jahre eingeführt wurde (Makler, 1979, 1980, 1981). Es wurde seit dem Ende der 80er Jahre kontinuierlich evaluiert und standardisiert (Davis et al., 1989, Makler et al., 1991, Davis et al., 1992; Vantman et al., 1989; Kraus et al., 1995; Hirano et al., 2001) Das

von uns verwendete System ist das Strömberg-Mika Cell-Motion-Analysis System (SM-CMA). Verschiedene Grundeinstellungen können vorgenommen werden (Tabelle 4). Bei Einhaltung von standardisierten Bedingungen und der empfohlenen Richtlinien gelten die Ergebnisse der CASA als wiederholbar und zuverlässig (*Mortimer et al., 1995; European Society of Human Reproduction and Embryology 1996*).

Die Auswertung erfolgt automatisch, wobei das Programm die einzelnen Pixelgruppen differenzieren kann und Spermatozoen von anderen Zellen unterscheidet. Diese Auswahl wurde durch eine zusätzliche Schwanzdetektion noch präzisiert (*Krause & Schönherl, 1993*). Spermatozoen mit einer Geschwindigkeit unter $5\mu\text{m/s}$ werden als immotil bewertet, solche mit einer Geschwindigkeit zwischen $5\mu\text{m/s}$ und $15\mu\text{m/s}$ werden als lokal motil klassifiziert und Spermatozoen mit einer Geschwindigkeit über $15\mu\text{m/s}$ als motil.

Diese Methode ermöglicht eine weitgehend untersucherunabhängige Messung, die zudem standardisiert abläuft. Die Einflussfaktoren auf die Zielgröße werden somit auf ein Minimum reduziert. Fehler können durch Geräteeinstellung, Auswahl nicht repräsentativer Blickfelder und unterschiedliche Aufbereitung der Proben entstehen (*Neuwinger et al., 1990 a, b; Köhn et al., 1993; Hinney et al., 1993; Davis et al., 1995*). CASA-Parameter können die Bewegung humaner Spermatozoen prinzipiell in drei Kategorien unterteilen, welche wiederum eine Klassifizierung in Unterklassen erlauben: Neben der Motilität konnten mit dieser Technik auch Bahn- und Geschwindigkeitsparameter der Spermatozoen analysiert werden. Die Parameter gliedern sich wie folgt:

1. Prozentuale Motilität (%)

a) - Immotile

b) - Lokal Motile

c) – Motile

c) 1. Bewegungsart (%)

a) Kreisläufer, b) - Nicht Lineare, c) – Lineare, d) - Hyperaktivierte

c) 2. Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)

1. VSL (Velocity Straight Linear): Lineare Geschwindigkeit, Progressivgeschwindigkeit. Gemittelte Geschwindigkeit des Spermatozookopfes auf der evaluierten Gerade zwischen Start- und zuletzt bestimmten Messpunkt.

2. VCL (Velocity Curve Linear): kurvenlineare Geschwindigkeit, Spurgeschwindigkeit. Mittlere Geschwindigkeit des Spermatozookopfes

entlang der tatsächlichen Bahn, die sich in den zwei Dimensionen des Gesichtsfeldes darstellt.

3. VAP (Velocity Average Path): Pfadgeschwindigkeit: Gemittelte Geschwindigkeit entlang der räumlichen Bahn des Spermatozoonkopfes

Hierbei gelten die Punkte c)1. und c)2. nur für den Unterpunkt 1. c (Abb. 14).

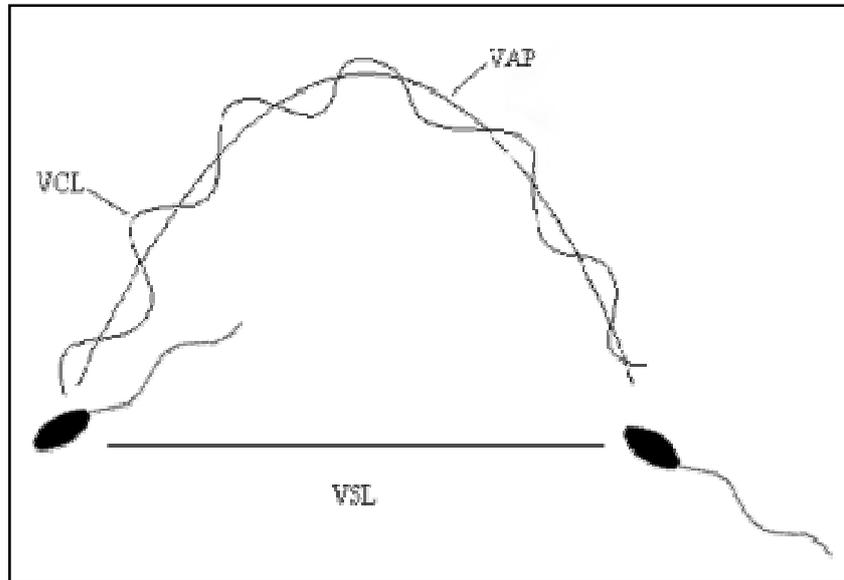


Abb. 14: Darstellung der grundlegenden Bahnen zur Berechnung der Geschwindigkeitsparameter VSL, VAP und VCL. VSL entspricht der WHO Klassifikation A: Progressiv Motile Spermatozoen (Ludwig et al., 1996).

Darüber hinaus ermöglicht dieses System eine Auswertung der Konzentration, die in mittleren Konzentrationsbereichen den Ergebnissen herkömmlicher Auszählungen entspricht. Die Software erlaubt es, die Grundeinstellungen zu verändern, es ist somit möglich, Spermatozoen verschiedener Spezies mit diesem System auszuwerten. Die Parameter der Grundeinstellungen unseres Systems sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die Einstellung erfolgt gemäß den Empfehlungen des Geräteherstellers und wurde für sämtliche Versuche beibehalten.

3. 10. 2. Motilitätsmessungen an humanen Spermatozoen mittels CASA

Es wurde überprüft welche Auswirkungen AI und AII auf verschiedene Motilitätsparameter haben und inwiefern sich vorhandene Effekte durch die Rezeptorantagonisten Losartan[®], Saralasin und PD123319 beeinflussen lassen. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Untersuchungen zu AI jedoch nicht aufgeführt. Die Versuchsdurchführung folgte einem festgelegten, standardisierten Schema (Abb. 19). Die Datenerhebung wurde explorativ

durchgeführt. Die Datenauswertung konzentrierte sich auf die Parameter Motilität, Immotilität und Lokal Motile Spermatozoen.

3. 10. 2. 1. Einfluss von AII auf die Bewegung humaner Spermatozoen

a) Konzentrationsreihe

AII wurden in Aqua dest. zu einer Stammlösung von 10^{-3} M gelöst, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. AII in einer Konzentration von 10^{-5} bis 10^{-12} M eingesetzt. Von jeder Ejakulatprobe wurde ein Routinespermiogramm erstellt, anschließend erfolgte die Glaswollfiltration. Das Filtrat wurde in HTF-1%HSA gewaschen und das Pellet im entsprechenden Medium resuspendiert. Die Konzentration der Spermatozoen wurde auf 40 Mio. Spermien/ ml eingestellt und die Probe auf vorgewärmten Eppendorfcups zu je 1ml portioniert. Das Zusetzen der Substanzen zu den jeweiligen Proben erfolgte in einminütigem Abstand, um die Messzeit der Probe am CASA zu berücksichtigen. Der Kontrolle wurde dasselbe Volumen an A. dest. ohne den Zusatz von AII zugefügt. Die Proben wurden anschließend 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels CASA nach 15 Minuten und 60 Minuten. Eine weitere Messung wurde nach einem anschließend durchgeführten Waschschrift durchgeführt. Hierzu wurde die Probe in 5ml HTF-1%HSA resuspendiert, bei $400\times g$ zentrifugiert und das Pellet erneut in einem Gesamtvolumen von 1ml in HTF-1%HSA resuspendiert. Damit sollte die zugesetzte Substanz aus der Probe weitgehend ausgewaschen werden, um einen eventuellen nachhaltigen Effekt der Substanzen zu untersuchen. Während der Messungen wurden die Proben auf einer 37° -Wärmeplatte, in einem Eppendorfcup-Ständer aufbewahrt. Zwischen den Messungen wurden die Proben wieder in den Wärmeschrank gestellt. Um ein Verdunsten der Probenflüssigkeit zu verhindern, wurden die Eppendorfcups nur kurz, zum Abpipetieren der Messprobe geöffnet.

| Parameter und Richtwert | Erläuterung |
|--------------------------------|---|
| FRMAX: 30 | Anzahl der Bilder der Sequenz |
| FRMIN: 15 | Anzahl der Bilder, die ein Objekt mindestens erkannt werden muss, um als Spermatozoon gezählt zu werden |
| TIME: 20 | Zeit zwischen zwei Videohalbbildern |
| AREAMIN: 35 | Untere Flächengrenze in Pixel, über die ein Objekt fallen muss, um in die Auswertung einzugehen |
| AREAMAX: 350 | Obere Flächengrenze in Pixel, unter die ein Objekt fallen muss, um in die Auswertung einzugehen |
| OBJECTS: light | Durch die Phasenkontrastmikroskopie erscheinen die Objekte heller, als der Hintergrund |
| CLASS: 3 | Klasseneinteilung der Geschwindigkeit (numerisch) in $\mu\text{m/s}$ |
| IMO: 5 | Geschwindigkeitsgrenze für immotile Objekte in $\mu\text{m/s}$ |
| LOC: 15 | Geschwindigkeitsgrenze für lokal motile Objekte in $\mu\text{m/s}$ |
| DEPTH: 10 | Tiefe der Messkammer in μm |
| COLUMNS: 2 | Anzahl der zu bearbeitenden, horizontalen Zeilen |
| PDIST: 31 | Kreisradius in Pixel, in dem Objekte zugeordnet werden |
| VANISH: 2 | Anzahl der Bilder, bei denen ein Spermatozoon weiter berücksichtigt wird, falls es bei einer Drehung, bedingt durch die flache Form, unter die Messebene getaucht ist. |
| SELDIR: on | Zuordnung der Teilbahnen, entsprechender Algorithmus untersucht die Richtung einer Bahn als Bahnparameter |
| CORRECT: on | Videokamera liefert Bilder im „Interlaced-Betrieb“, → aufeinander folgende Halbbilder in horizontaler Richtung, jeweils um eine Zeile, verschoben. Schwerpunktsermittlung korrigiert diesen Fehler. |
| TUKEYWIN: 4 | Größe des linearen Tukeyfensters, mit dem die Bahnen geglättet werden |
| TAIL: light | Mustererkennung linienhafter Strukturen an den Kopfenden der Objekte, die heller sind als der Hintergrund |
| CALIBRATION: 390 | Eichfaktor für das verwendete Kamera-Mikroskopobjekt |
| SEQMODE: on | Die analysierten Bilder werden vom Sequenzspeicher geladen |

Tabelle 4: Die Grundeinstellungen der CASA mit den empfohlenen Werten

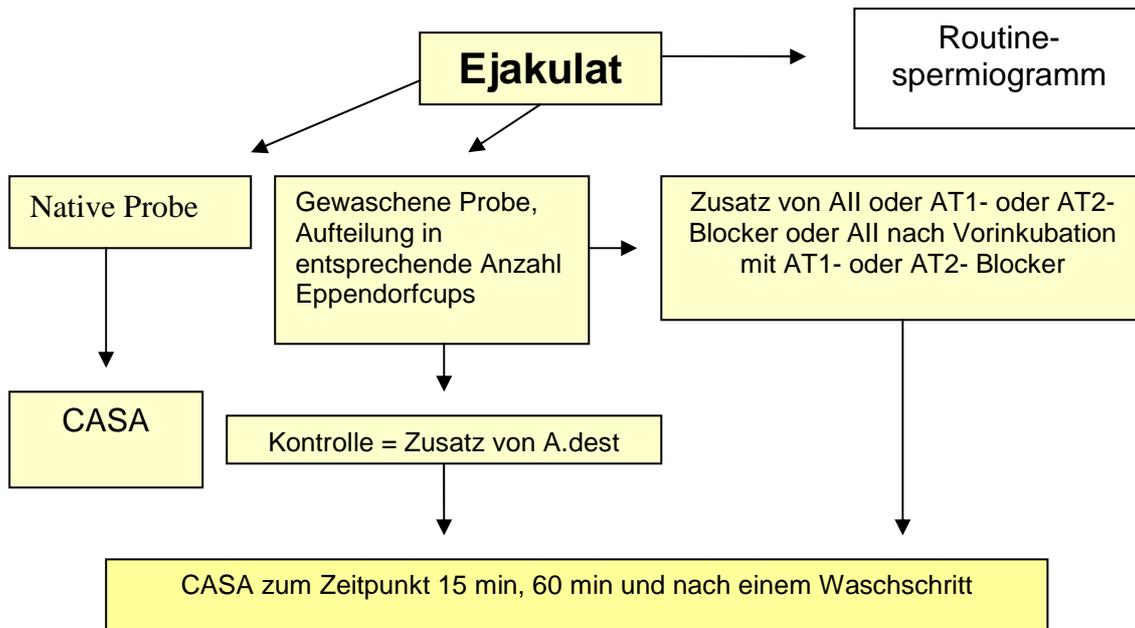


Abb. 15: Kurzprotokoll für die Durchführung der Motilitätsbestimmungen mittels CASA. Nach Aufbereitung des Ejakulats wurden CASA-Messungen einer Nativprobe sowie aufbereiteter Proben mit den entsprechenden Zusätzen nach 15min und 60 min sowie nach einem Waschschrift durchgeführt.

b) Effekt von AII auf CASA-Parameter

Für diesen Versuch erfolgte eine Aufteilung der aufgearbeiteten Probe in fünf Eppendorfcups. Eine Kontrolle, der nur A. dest. zugesetzt wurden und zwei Proben, die zum einen AII in einer Konzentration von 10^{-7}M und zum anderen 10^{-9}M enthielten wurden nach Inkubationszeiten von 15 Minuten, 60 Minuten und nach einem Waschschrift in HTF-1% HSA (zur Entfernung des A II) ausgewertet. Die Proben wurden während der Messzeit auf einer Wärmeplatte bei 37°C aufbewahrt, zwischen den Messungen wurden sie wieder in den Wärmeschrank gestellt.

3. 10. 2. 2. Losartan[®], Saralasin, PD123319

a) Konzentrationsreihe

Die Blocker Losartan, Saralasin und PD123319 wurden zu einer Stammlösung von 10^{-3} M in A. dest. gelöst und aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. Den vorbereiteten Spermatozoenansätzen wurden die Blocker in den verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Endkonzentrationen betragen je 10^{-5} M ansteigend in Zehnerschritten bis zu 10^{-12} M. Den Proben wurde nach einer Inkubation von 10 Minuten AII in einer Konzentration von 10^{-9} M zugesetzt. Es wurden zwei Kontrollen durchgeführt: Zum einen wurde A. dest. statt des addierten Volumens des Zusatzes von AII und des Blockers, zugesetzt. Zum anderen wurde der Blocker ohne AII zugesetzt, um festzustellen, ob dieser eine AII-unabhängige Wirkung besitzt. In diesem Ansatz wurde das Volumen an AII-Zusatz durch Zugabe von A. dest. berücksichtigt.

b) Effekt von Losartan[®], Saralasin und PD123319 auf die motilitätssteigernde Wirkung von AII

Um festzustellen, ob die Rezeptorblocker Losartan[®], Saralasin und PD123319 einen Effekt auf die durch AII vermittelte Wirkung besitzen, wurde die Probe in vier Eppendorfcups aufgeteilt. Das Cup Nr. 1 enthielt die Negativkontrolle, dem das entsprechende Volumen A. dest. der Zusätze der anderen Proben zugefügt wurde.

Cup Nr. 2 enthielt die Positivkontrolle, als Zusatz wurde AII in einer Endkonzentration von 10^{-9} M zugefügt. Cup Nr. 3 enthielt eine 2. Negativkontrolle, es wurde der entsprechende Rezeptorblocker (Losartan[®], Saralasin oder PD123319) ohne AII in einer Konzentration von jeweils 10^{-7} M zugefügt.

Das Cup Nr. 4 enthielt den jeweiligen Rezeptorblocker entsprechend dem Cup Nr. 3. Nach fünf Minuten Inkubation wurde AII in einer Endkonzentration von 10^{-9} M zugesetzt. Die Messzeitpunkte wurden auf 15 und 60 Minuten festgelegt. Eine weitere Messung erfolgte nach einem angeschlossenen Waschschrift in HTF-1%HSA, um die zugesetzten Substanzen zu entfernen. Die Proben wurden während der Messungen auf einer Wärmeplatte bei 37°C aufbewahrt und zwischen den Messungen in den Wärmeschrank gestellt.

Die Rezeptorantagonisten Saralasin und PD123319 wurden zusammen untersucht. Somit lagen hier 5 Proben vor (AII, Saralasin, Saralasin + AII, PD und PD + AII). Daher entsprechen sich die Messwerte der AII modulierten Motilitätsänderungen von den jeweiligen Tabellen und Graphen.

3. 11. Statistische Auswertung

Die Datenerhebung in dieser Arbeit erfolgte, sofern nicht anders aufgeführt, explorativ. Die statistische Auswertung der CASA-Ergebnisse wurde von *Dr. Boedecker* und *Frau Scheibelhut* (*Arbeitsgruppe „Medizinische Statistik“ am Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen*) durchgeführt. Hierzu wurden die Daten mit dem Statistikprogramm SAS in einem Vorzeichenrangtest (modifizierter Wilcoxon-Test) geprüft. Hierbei wurden die statistischen Überlegungen bei der Versuchsplanung berücksichtigt und auf eine genaue Dokumentation aller Ergebnisse und methodischen Variationen bestanden. Da die meisten physiologischen Parameter nicht standardnormal verteilt sind, dies gilt ebenfalls für Motilitätsparameter humaner Spermatozoen, erfolgen die Angaben als Median +/- Mittlere Abweichung. Der adäquate Schätzer ist in diesem Falle der Hodges-Lehmann-Schätzer. Nur dort wo eine Normalverteilung vorausgesetzt werden konnte, wurde der Mittelwert +/- Standardabweichung angeführt.

Der Begriff „*signifikant*“ wird hier nicht im Sinne einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < x$ gewählt sondern als deskriptiver Begriff eines tatsächlichen statistischen Unterschiedes.

Die ELISA-Untersuchung erfolgte confirmatorisch. Die statistische Auswertung wurde ebenfalls von Herrn Dr. Boedecker und Frau Scheibelhut durchgeführt. Die getesteten drei Kollektive wiesen dabei offensichtlich die gleiche Lage auf, daher wurde vor allem die Variabilität zwischen den drei Kollektiven untersucht. Voraussetzung für den Test auf Gleichheit der Variabilität im Sinne der Null-Hypothese war dennoch die Bewertung auf Unterschiede des Medians. Anders ausgedrückt:

Trotz der offensichtlichen Übereinstimmung der drei Mediane wurde eine statistische Auswertung durchgeführt. Dies erfolgte nicht, um das Offensichtliche zu bewerten, sondern als Voraussetzung für den weiteren Test.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe eines nichtparametrischen Tests die Gleichheit der Variabilität untersucht. Aus den möglichen Tests wurde der *Test nach Siegel-Tukey* ausgewählt.

Für qualitative Versuche wurde keine statistische Auswertung durchgeführt (Immunzytochemie, Western-Blot).

4. Ergebnisse

4. 1. Immuncytochemische Lokalisation von AII- Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 auf humanen Spermatozoen

Mittels Immunzytochemie gelang der Nachweis der AII Rezeptoren auf humanen Spermatozoen. AII Rezeptoren zählen zu den heptohelikalen Neurotransmitter- und Hormonrezeptoren. Erstmals wurde hierbei auch der AII-Rezeptor-Typ 2 auf humanen Spermatozoen nachgewiesen. Für alle Reaktionen galt, dass die besten Ergebnisse nach Fixierung mit eisgekühltem Methanol erzielt wurden. Fixierungsversuche mit Paraformaldehyd führten zu verwaschenen, nicht zu gebrauchenden Präparaten.

4. 1. 1. Nachweis von AT1 auf humanen Spermatozoen

Die AT1- spezifischen Antikörper AT1- N10 und AT1- 306 wurden eingesetzt, um AT1 mittels Immunzytochemie an nicht kapazitierten Spermatozoen nachzuweisen. Dabei gelang der Nachweis lediglich beim Einsatz des Antikörpers AT1- 306. Dieser Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuren 306 – 359 des humanen AT1. An nicht kapazitierten Spermatozoen zeigte sich eine Markierung in der postakrosomalen Region, am Mittelstück und am Flagellum bei ca. 90% der gezählten Spermatozoen (Abb. 20).

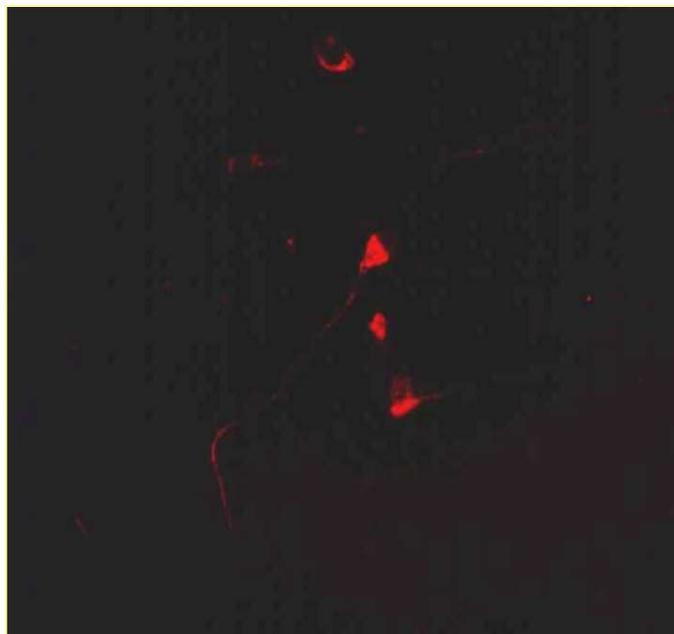


Abb. 16: Immuncytochemischer Nachweis des AT1 im Bereich der postakrosomalen Region, dem Mittelstück und am Flagellum humaner, nicht kapazitierter Spermatozoen, durch Einsatz des spezifischen Antikörpers AT1- 306. (Leitz-Fluoreszenz-Mikroskop DM-RD/RE, 400x Vergrößerung, Leitz GmbH, Wetzlar)

Die Vorbehandlung des Antikörpers mit Kontrollpeptid führte zu keiner Immunreaktion an humanen, nicht kapazitierten Spermatozoen, welches die Antigenspezifität des Antikörpers bestätigt. In einer zweiten Kontrolle wurde TBS-Puffer ohne Primärantikörper aufgetragen, was ebenfalls dazu führte, dass es zu keiner Immunreaktion kam.

Beide Kontrollen belegen die Spezifität des Primärantikörpers und sprechen gegen eine unspezifische Bindung durch den Sekundärantikörper.

Weiterhin wurde eine Doppelmarkierung mit DAPI durchgeführt, um die DNA anzufärben und somit die Relation zur immunzytochemischen Markierung durch den Primärantikörper AT1- 306 aufzuzeigen. Hierdurch verdeutlichte sich der Nachweis des AT1 im postakrosomalen Bereich, dem Mittelstück und dem Flagellum humaner Spermatozoen (Abb. 21).

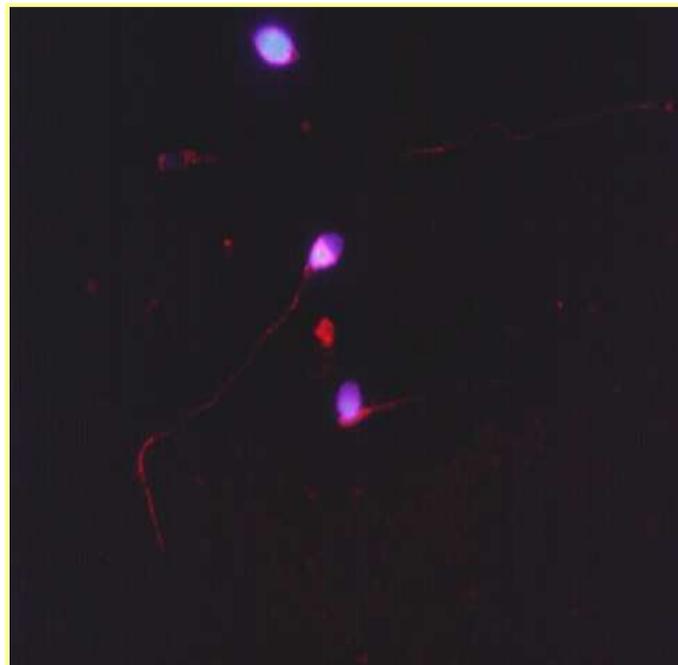


Abb. 17: Immuncytochemischer Nachweis des AT1 im Bereich der postakrosomalen Region, dem Mittelstück und am Flagellum humaner, nicht kapazitierter Spermatozoen, durch Einsatz des spezifischen Antikörpers AT1-306. Doppelmarkierung mit DAPI, zur Detektion des Nukleus. Die hellere Region im postakrosomalen Bereich erklärt sich durch die Überlagerung der Markierung des AT1 durch AT1- 306 und der Markierung des Nukleus durch DAPI. (Leitz-Fluoreszenz-Mikroskop DM-RD/RE, 400x Vergrößerung, Leitz GmbH, Wetzlar)

4. 1. 2. Nachweis von AT2 auf humanen Spermatozoen

Die beiden AT2- Antikörper AT2- C18 und AT2- N19 wurden eingesetzt, um den AT2 auf humanen Spermatozoen nachzuweisen und zu lokalisieren. Hierbei zeigte sich eine immunocytochemische Markierung lediglich unter Einsatz des AT2- C18. Dabei wurde das Akrosom intensiv angefärbt, wo hingegen die übrigen Spermatozoenanteile keine Markierung aufwiesen (Abb. 22).

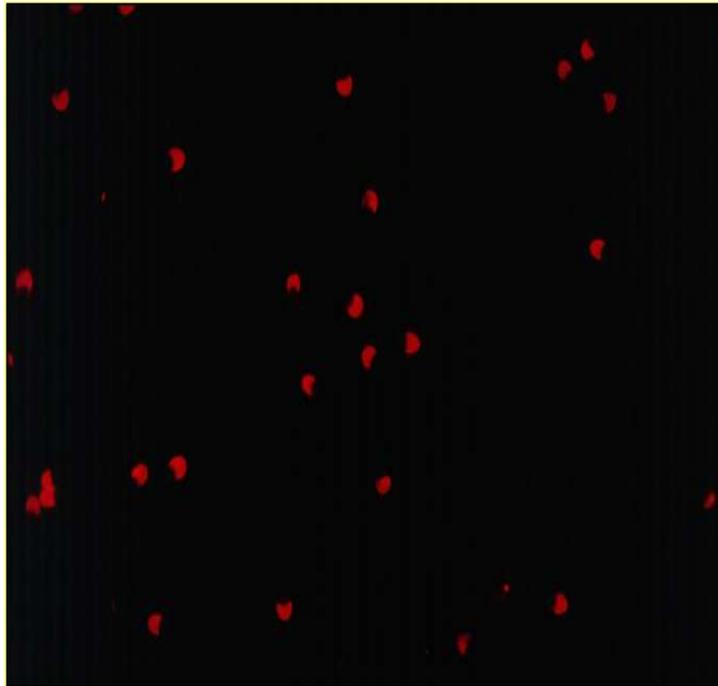


Abb. 18: Immunocytochemischer Nachweis des AT2 im Bereich der akrosomalen Region humaner, nicht kapazitierter Spermatozoen durch Einsatz des spezifischen Antikörpers AT2- C18. Postakrosomale Region, Mittelstück und Flagellum zeigen keine Markierung. (Leitz-Fluoreszenz-Mikroskop DM-RD/RE, 400x Vergrößerung, Leitz GmbH, Wetzlar).

Es zeigte sich eine Markierung bei 60 – 90% der Spermatozoen. Die Streuung schien dabei spenderabhängig zu sein.

Eine Vorbehandlung des Antikörpers mit Kontrollpeptid führte zu keiner Immunreaktion an humanen, nicht kapazitierten Spermatozoen. Ebenso bei Einsatz von TBS- Puffer ohne Primärantikörper kam es zu keiner Immunreaktion.

Beide Kontrollen belegen die Spezifität des Primärantikörpers und sprechen gegen eine unspezifische Bindung durch den Sekundärantikörper.

Des Weiteren wurde eine Doppelmarkierung mit DAPI durchgeführt, um die DNA anzufärben und somit die Relation zur immunocytochemischen Markierung durch den

Primärantikörper AT2-C18 aufzuzeigen. Hierdurch verdeutlichte sich der Nachweis des AT2 im akrosomalen Bereich, unter Aussparung der postakrosomalen Region, des Mittelstücks und des Flagellums humaner Spermatozoen (Abb. 23).

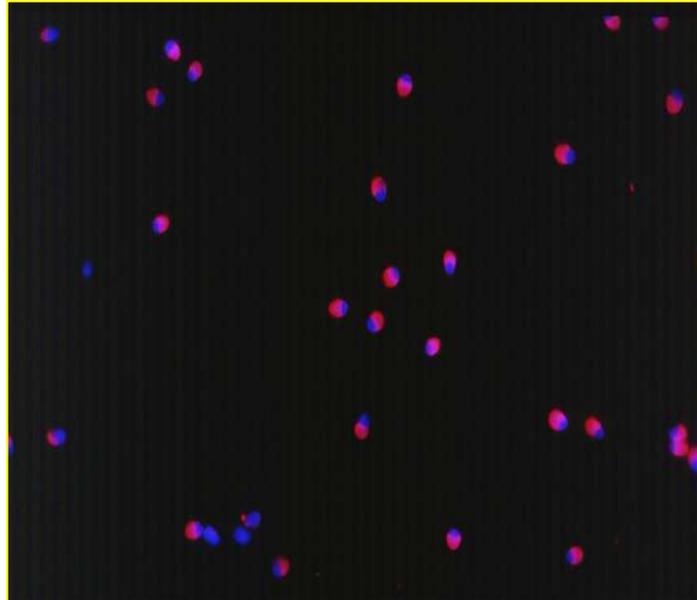


Abb. 19: Immuncytochemischer Nachweis des AT2 im Bereich der akrosomalen Region humaner, nicht kapazitierter Spermatozoen durch Einsatz des spezifischen Antikörpers AT2-C18. Postakrosomale Region, Mittelstück und Flagellum zeigen keine Markierung. Doppelmarkierung mit DAPI, zur Detektion des Nukleus. Die Änderung der Farbe in der akrosomalen Region gegenüber Bild 15 erklärt sich durch die Überlagerung der Markierung des AT2 durch AT2-C18 und der Markierung des Nukleus durch DAPI. (Leitz-Fluoreszenz-Mikroskop DM-RD/RE, 400x Vergrößerung, Leitz GmbH, Wetzlar).

4. 1. 3. Immuncytochemischer Nachweis des AT2 in Abhängigkeit von der Akrosomalen Reaktion

Um die Abhängigkeit des immuncytochemischen Nachweises des AT2 auf humanen Spermatozoen von der akrosomalen Reaktion zu untersuchen, wurden Spermatozoen von drei gesunden Spendern, bei denen der AT2 sicher nachzuweisen war, mit 10 μ M Ionophor A23187 inkubiert. Der Zustand des Akrosoms wurde mit FITC-PSA untersucht. Mittels Dreifachmarkierung durch AT2-C18 (Primärantikörper), DAPI (DNA-Markierung) und FITC-PSA (Akrosom) zeigte sich eine übereinstimmende Markierung des Akrosoms und der Markierung durch AT2- C18 (Abb. 24).

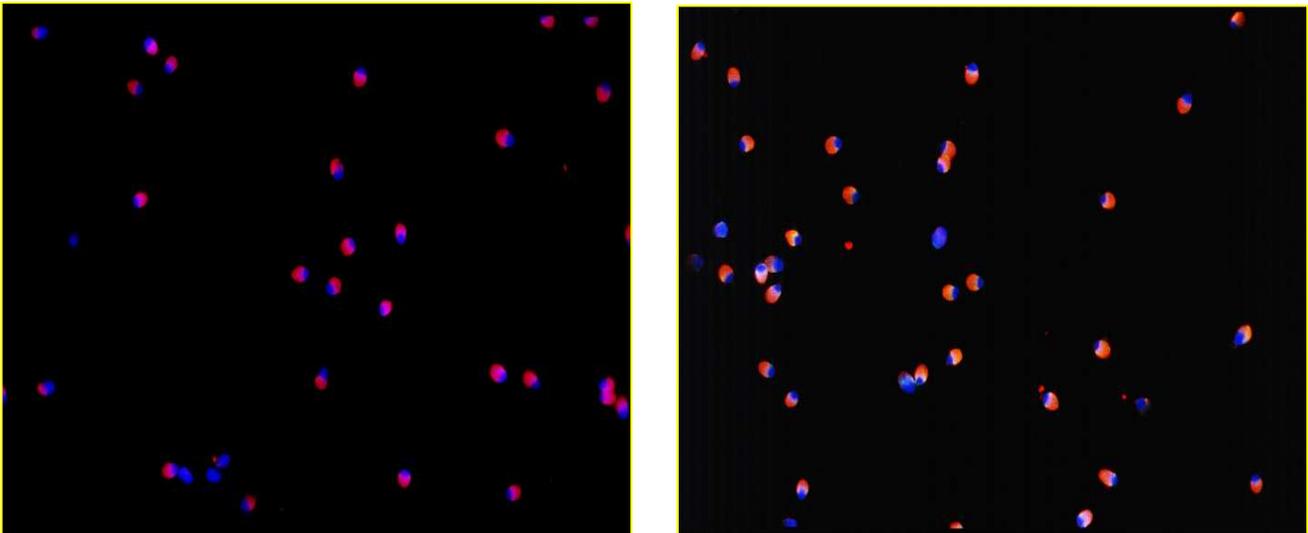


Abb. 20 a und b: Immuncytochemischer Nachweis des AT2 im Bereich der akrosomalen Region humaner, kapazitierter Spermatozoen durch Einsatz des spezifischen Antikörpers AT2-C18.

20a: Doppelmarkierung mit DAPI, zur Detektion des Nukleus. Die Änderung der Farbe in der akrosomalen Region gegenüber Bild 15 erklärt sich durch die Überlagerung der Markierung des AT2 durch AT2-C18 und der Markierung des Nukleus durch DAPI.

20b: Dreifachmarkierung mit FITC-PSA zur Kontrolle des Akrosoms. Die Intaktheit des Akrosoms zeigte sich durch die gelbe Fluoreszenz. Die Überlagerung der drei Farben (Rot= AT2, Blau= DNA und Gelb= Akrosom ergibt die unterschiedliche Fluoreszenz gegenüber Abb. 24a. (Leitz-Fluoreszenz-Mikroskop DM-RD/RE, 400x Vergrößerung, Leitz GmbH, Wetzlar)

Die Vorbehandlung des Antikörpers mit Kontrollpeptid führte zu keiner Immunreaktion an humanen, kapazitierten Spermatozoen. Als zweite Kontrolle wurde TBS- Puffer ohne Primärantikörper aufgetragen. Auch hier zeigte sich keine Immunreaktion. Dies kennzeichnet Spezifität des Primärantikörpers und spricht gegen eine unspezifische Bindung durch den Sekundärantikörper.

4. 2. Immunoblot

Die Spezifität der verwendeten Antikörper AT1-306 und AT2-C18 sowie der qualitative Nachweis der Rezeptoren auf humanen Spermatozoen wurde mittels Western-Blot überprüft. Hierzu wurden fraktionierte Spermatozoenbestandteile in einer SDS-Gelelektrophorese aufgeteilt und im Immunoblotting weitergehend untersucht. Es zeigte sich eine Immunreaktion einzelner Komponenten im Bereich des Molekulargewichtes von humanen AT2 aus Nebennierengewebe (=Positivkontrolle) bei etwa 43 kDa. Zum Versuchszeitpunkt waren keine kommerziellen Positivkontrollen für den AT1- Rezeptor zu beziehen. Ergänzend wurde eine zweite Negativkontrolle in den Versuch eingebaut. Beim Nachweis des AT1 wurde ebenso die AT2- Positivkontrolle verwendet.

4. 2. 1. Angiotensin II Rezeptor Typ1 (AT1)

Im Immunoblot (Western-Blot) identifizierte der AT1-306 eine einzelne Proteinbande mit einem ungefähren Molekulargewicht bei 41 kDa (Abb. 25). Dies entspricht dem Molekulargewicht von AT1 vieler verschiedener Säugetiergewebe (*Griendling et al., 1996; Gur et al., 1998*). Die Negativkontrolle (kein Primärantikörper) zeigte keine

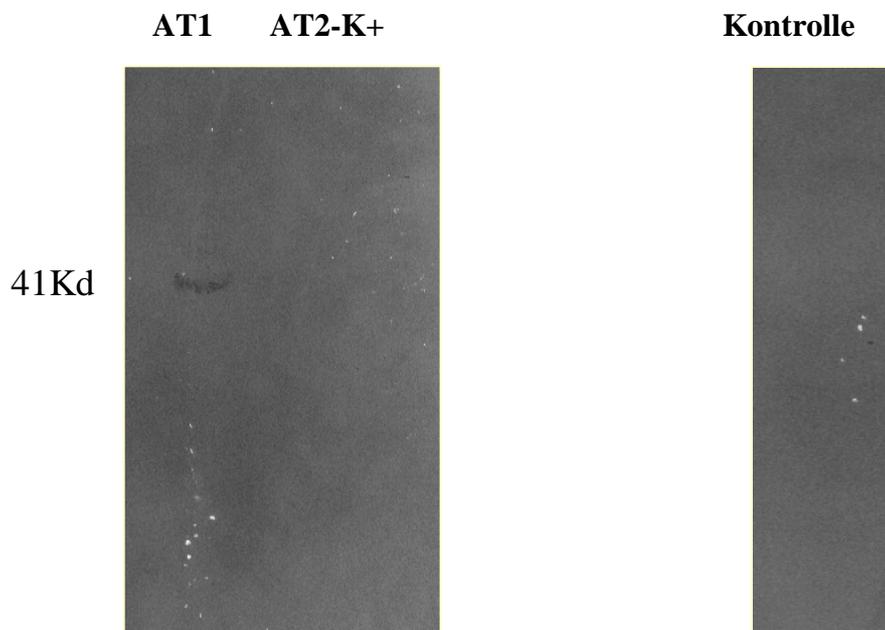


Abb. 21: Nachweis des AT1 mittels Western-Blot. Bei Einsatz des AT1-Antikörpers AT1 (306) bei 41Kd zeigte sich eine schmale Bande in der Spur der Probe, die die Flagellae enthält. Der AT2-Antikörper AT2-C18 zeigte in dieser Probe keine Reaktion. Die Negativkontrolle blieb ohne Markierung.

Banden. Auch eine AT2-Positivkontrolle zeigte keine Bande (zusätzliche Negativkontrolle) als Nachweis für die Spezifität des AT1-Antikörpers.

4. 2. 2. Angiotensin II Rezeptor Typ 2

Im Immunoblot (Western-Blot) zeigte sich in der Probe, die die Spermatozoenköpfe enthielt, unter Verwendung des AT2-Antikörpers, eine Bande bei ca. 43 kD. Die Negativkontrolle zeigte keine Bande, die Positivkontrolle (KNRK-Whole-Cell-Lysate, Santa-Cruz, Heidelberg) zeigte eine Reaktion auf gleicher Höhe (Abb. 26).

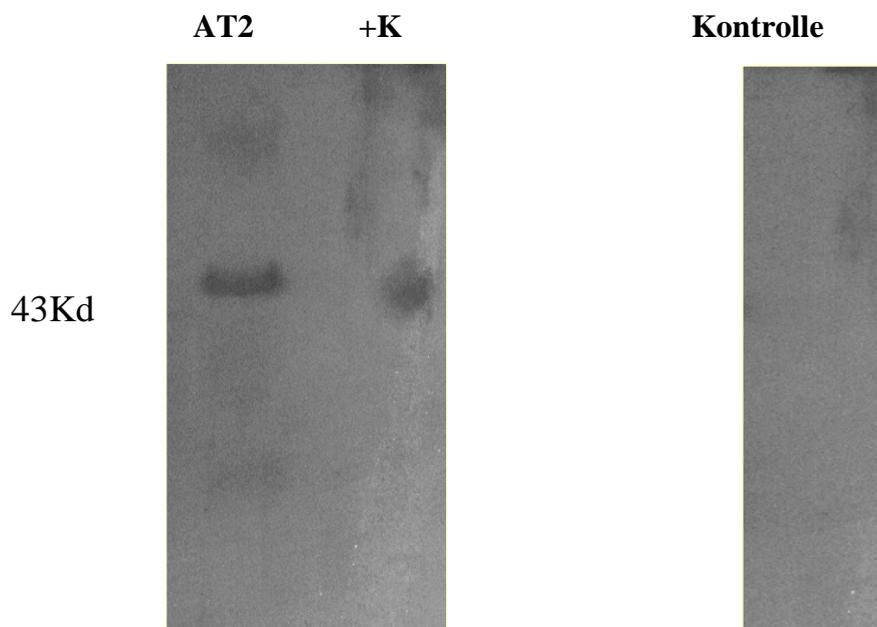


Abb. 22: Nachweis des AT2 mittels Western-Blot. Bei Einsatz des 43Kd Antikörpers AT2-C18 zeigte sich eine schmale Bande in der Spur der Probe, die die Spermatozoenköpfe enthält. Der AT2-Antikörper AT2-C18 wies in der Probe der AT2-Positivkontrolle (K+, KNRK-Whole-Cell-Lysate) ebenfalls eine Reaktion auf. Die Negativkontrolle blieb ohne Markierung.

4. 3. ELISA

Mittels ELISA wurde die Konzentration von AII im Seminalplasma von drei unterschiedlichen Probandengruppen mit je $n=13$ ermittelt (Tabelle 5 und 6, Abb. 27 und 28).

1. Gesunde Probanden, Spermogrammparameter entsprachen WHO-Richtlinien.
2. Vasektomierte Männer der urologischen Praxis Dr. Braun in Gießen.
3. Patienten der andrologischen Ambulanz der Hautklinik des Universitätsklinikums Gießen.

0-Hypothese: Die Konzentration an AII im Seminalplasma von gesunden Probanden, andrologischen Patienten und vasektomierten Männern ist in allen Gruppen gleich, resp. zwischen den Gruppen gibt es keinen Unterschied im Gehalt an AII im Seminalplasma.

H-1: Der Gehalt an AII im Seminalplasma von gesunden Probanden, Vasektomierten und andrologischen Patienten ist nicht gleich. Zwischen den Gruppen gibt es einen Unterschied.

Konfidenzintervall 95% (Signifikanzniveau 0,05), Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ ist signifikant. Der Parameter ist nicht standardnormalverteilt. Auswertung daher mit nicht-parametrischem Test.

Die höchste Streuung wies die Patientengruppe auf (Siehe Tabelle 5, Abb. 23 und 24.).

Der Median in der Patientengruppe betrug 1 ng/ml mit Streuungen von $0,19 \text{ ng/ml}$ bis $6,9 \text{ ng/ml}$ (Min/Max). In der Gruppe der vasektomierten Männer $0,9 \text{ ng/ml}$ (Min: $0,2 \text{ ng/ml}$, Max: $1,4 \text{ ng/ml}$) und in der Probandengruppe ebenfalls $0,9 \text{ ng/ml}$ (Min: $0,55 \text{ ng/ml}$, Max: $1,2 \text{ ng/ml}$). Die Streuung war somit in der Patientengruppe am größten.

Aufgrund der offensichtlichen Lagegleichheit des Medians macht es für diese drei Stichproben wenig Sinn, die Mediane zu vergleichen. Die drei Gruppen unterscheiden sich augenscheinlich jedoch durch die Variabilität. Dennoch muss als Voraussetzung für den Test auf Gleichheit der Variabilität als erstes mit dem Median-Test untersucht werden, ob sich Unterschiede bezüglich des Medians der Verteilung aufzeigen lassen. In diesem Fall zeigte sich erwartungsgemäß kein Unterschied ($p=0,65$) und die Nullhypothese kann beibehalten werden (Tabelle 6). Das bedeutet, dass es keinen Unterschied der AII-Konzentration in den drei Gruppen gibt. Sowohl gesunde Probanden, Patienten der andrologischen Ambulanz, als auch vasektomierte Männer weisen eine AII-Konzentration von ca. 1 ng/ml auf.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe eines nichtparametrischen Tests die Gleichheit der Variabilität untersucht. Aus den möglichen Tests wurde der Test nach Siegel-Tukey ausgewählt. Für den paarweisen Vergleich zwischen den Gruppen 1 (Patienten) und 2 (vasektomierte Männer) ergab sich eine Wahrscheinlichkeit für das beobachtete oder ein extremeres Ereignis von $p=0,016$, zwischen den Gruppen 1 und 3 (gesunde Probanden) $p=0,021$ und zwischen den Gruppen 2 und 3 $p=0,959$ (Übersicht in Tabelle 7). Es finden sich also deutliche Hinweise, dass zwischen den Gruppen 1 und 2 bzw. 1 und 3 Unterschiede

bezüglich der Dispersion der Verteilungen bestehen und hier die 0-Hypothese verworfen werden muss.

| | Patienten (Gr. 1) | Vasektomierte (Gr. 2) | Probanden (Gr. 3) |
|---------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Probe 1 | 1 | 0,65 | 1,1 |
| Probe 2 | 2,8 | 1,05 | 1 |
| Probe 3 | 6,9 | 0,9 | 0,8 |
| Probe 4 | 1,4 | 0,85 | 0,75 |
| Probe 5 | 0,6 | 1,1 | 0,57 |
| Probe 6 | 0,6 | 1,4 | 0,95 |
| Probe 7 | 5 | 1,4 | 1,1 |
| Probe 8 | 0,58 | 1 | 0,75 |
| Probe 9 | 0,95 | 0,95 | 0,85 |
| Probe 10 | 6,4 | 0,7 | 1,2 |
| Probe 11 | 2,9 | 0,8 | 1,2 |
| Probe 12 | 0,74 | 0,8 | 0,55 |
| Probe 13 | 0,19 | 0,2 | 0,9 |
| Median (ng/ml) | 1 | 0,9 | 0,9 |
| Min. | 0,19 | 0,2 | 0,55 |
| Max. | 6,9 | 1,4 | 1,2 |

Tabelle 5: Ergebnisse des AII-ELISA. Dargestellt sind die Konzentrationen an AII in den verschiedenen Proben (ng/ml, Median, kleinster Wert (Min.), größter Wert (Max.) in humanem Seminalplasma von gesunden Probanden (n=13), Patienten der andrologischen Ambulanz der Hautklinik Gießen (n=13) und vasektomierter Männer (n=13)

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Es wird deutlich, dass die höchste AII-Konzentration in der Gruppe der Vasektomierten gemessen wurde. Hier findet sich allerdings auch die größte Streuung der Werte (Abb. 23). Im Gegensatz dazu streuen die Werte der beiden anderen Gruppen eng um den Bereich 1ng/ml.

| | |
|--|-----------------------------|
| Vergleich der Mediane der drei Gruppen | Irrtumswahrscheinlichkeit p |
| | 0,65 |

Tabelle 6: Irrtumswahrscheinlichkeit p für die 0-Hypothese, Schlussfolgerung: Es gibt keinen Unterschied zwischen den Medianen der drei Gruppen (Gruppe 1: Probanden, Gruppe 2: Vasektomierte, Gruppe 3: andrologische Patienten).

| | Gruppe 1 vs. Gruppe 2 | Gruppe 1 vs. Gruppe 3 | Gruppe 2 vs. Gruppe 3 |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Unterschied | Signifikant p<0,05 (0,016) | Signifikant p<0,05 (0,021) | Nicht signifikant P=0,959 |

Tabelle 7: Ergebnisse des AII-ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse des nichtparametrischen Tests auf Gleichheit der Variabilität (Test nach Siegel-Tukey).

Gruppe 1: Patienten der andrologischen Ambulanz der Hautklinik Gießen (n=13), Gruppe 2: vasktomierter Männer (n=13), Gruppe 3: gesunde Probanden (n=13).

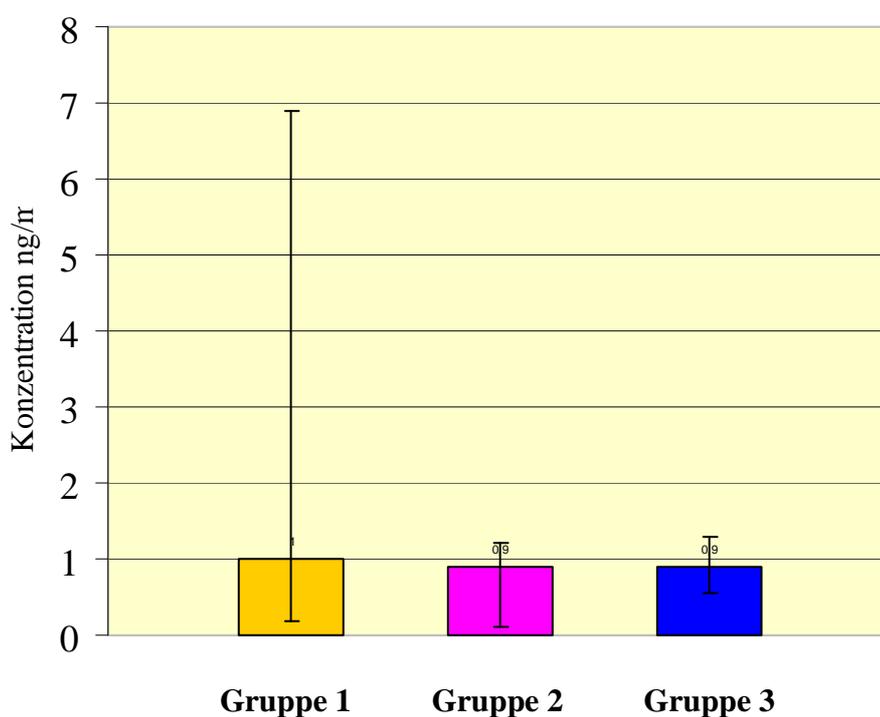


Abb. 23: Bestimmung der AII-Konzentration (ng/ml) in humanem Seminalplasma von Patienten der andrologischen Ambulanz der Hautklinik Gießen (Gruppe 1, n=13), vasktomierten Männern (Gruppe 2, n=13) und gesunden Probanden (Gruppe 3, n=13) mittels ELISA. Median +/- Max/Min. Der Vergleich der Mediane zeigt keinen Unterschied zwischen den Gruppen (p=0,65). Gruppe 1 unterscheidet sich jedoch in der Verteilung signifikant von Gruppe 2 (p= 0,016) und Gruppe 3 (p=0,021). Beachte die Skalierung der Ordinate.

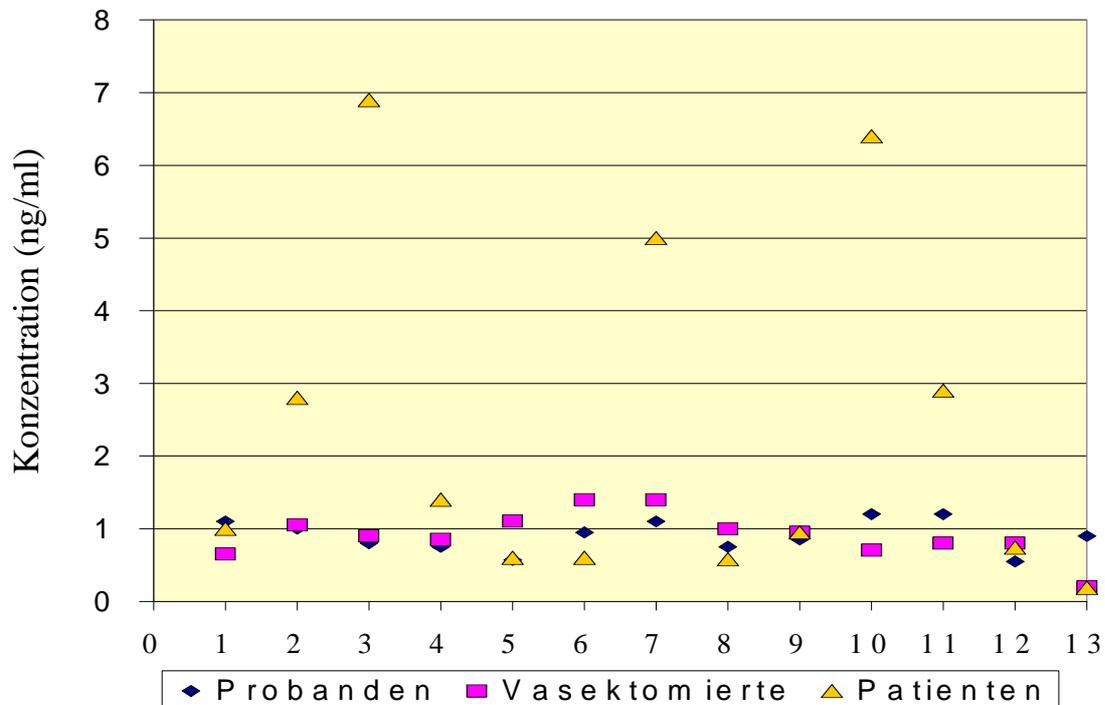


Abb. 24: Bestimmung der AII-Konzentration (ng/ml) in humanem Seminalplasma von gesunden Probanden ($n=13$), Patienten der andrologischen Ambulanz der Hautklinik Gießen ($n=13$) und vasektomierter Männer ($n=13$), mittels ELISA. Darstellung der einzelnen Messwerte.

Die mittlere Konzentration von AII konnte auf ca. 1 ng/ml Seminalplasma ermittelt werden. Diese entspricht somit der verwendeten AII-Konzentration 10^{-9} M in den Motilitätsversuchen.

4. 4. CASA

Erläuterungen zur Interpretation der Ergebnisse: Der Einfluss von AII auf humane Spermatozoen wurde mittels CASA explorativ untersucht. Dabei ergaben die Motilitätsmessungen an humanen Spermatozoen eine enorme Anzahl an Ergebnissen, von denen die wichtigsten im Folgenden angeführt werden sollen. Weil die Ergebnisse explorativ durchgeführt wurden, existiert keine 0-Hypothese. Dennoch lag eine Fragestellung vor: Es wurde untersucht ob AII einen Einfluss auf die Motilität humaner Spermatozoen hat.

Einführend wurden die Peptide AI und AII in einer Konzentration von 10^{-5} bis 10^{-12} M (AII) und 10^{-3} - 10^{-10} M (AI) zu den aufbereiteten Spermatozoensuspensionen zugesetzt. AII wurde so gewählt, dass der mittlere Wert aus der ELISA-Untersuchung (1ng/ml, etwa 10^{-9} M) in etwa in der Mitte der eingesetzten Konzentrationen lag. Nach 15 Minuten, 60 Minuten und nach einem zusätzlichen Waschschrift wurden die verschiedenen Geschwindigkeits- und Motilitätsparameter mit der CASA bestimmt. Diese Messungen wurden an einer kleinen Anzahl (n=3) gesunder Probanden durchgeführt, um Hinweise auf das Konzentrationsoptimum zu erhalten. Mit dieser Konzentration wurden die weiteren Messungen durchgeführt. Auf die Darstellung der Ergebnisse der Messungen nach Zugabe von AI wurde aufgrund der enormen Datenmenge verzichtet. Nicht dargestellt sind aus dem gleichen Grund des Weiteren die Ergebnisse der speziellen Motilitätsparameter wie unter 3. 10. 1 beschrieben (Bewegungsart und Geschwindigkeit). Abbildung 29 zeigt, dass AII lediglich in einem diskreten Konzentrationsintervall im Bereich von 10^{-9} M maximale Stimulation der Gesamtmotilität aufweist. Mit 10^{-9} M liegt der Konzentrationsbereich von AII im Bereich der K_m (=Michaeliskonstante: diejenige Substratkonzentration, bei der gerade die Hälfte des gesamten Enzyms als Enzymsubstratkomplex vorliegt und demzufolge die halbe Maximalgeschwindigkeit der Substratumsetzung erreicht ist). AI führt konzentrationsabhängig ebenfalls zu einer Motilitätssteigerung mit einem Konzentrationsoptimum bei 10^{-7} M, die Motilitätssteigerung ist jedoch geringer ausgeprägt als bei AII.

An einer größeren Anzahl gesunder, junger Probanden (n=23) sowie Patienten der andrologischen Ambulanz der Universitätshautklinik (n=17) wurde, entsprechend der vorab bestimmten Konzentrationsreihe, der Effekt von AII in der Konzentration 10^{-7} M und 10^{-9} M und zusätzlich nach einem Waschschrift in HTF-1% HSA untersucht. Die Auswertung erfolgte mit dem Wilcoxon-Test, einem nichtparametrischen Test, da Motilitätsparameter humaner Spermatozoen nicht standardnormal verteilt sind. Die Verteilungsunterschiede wurden mit dem Wilcoxon-Test und dem Hodges-Lehmann-Schätzer der medianen Differenzen als adäquaten Schätzer bestimmt.

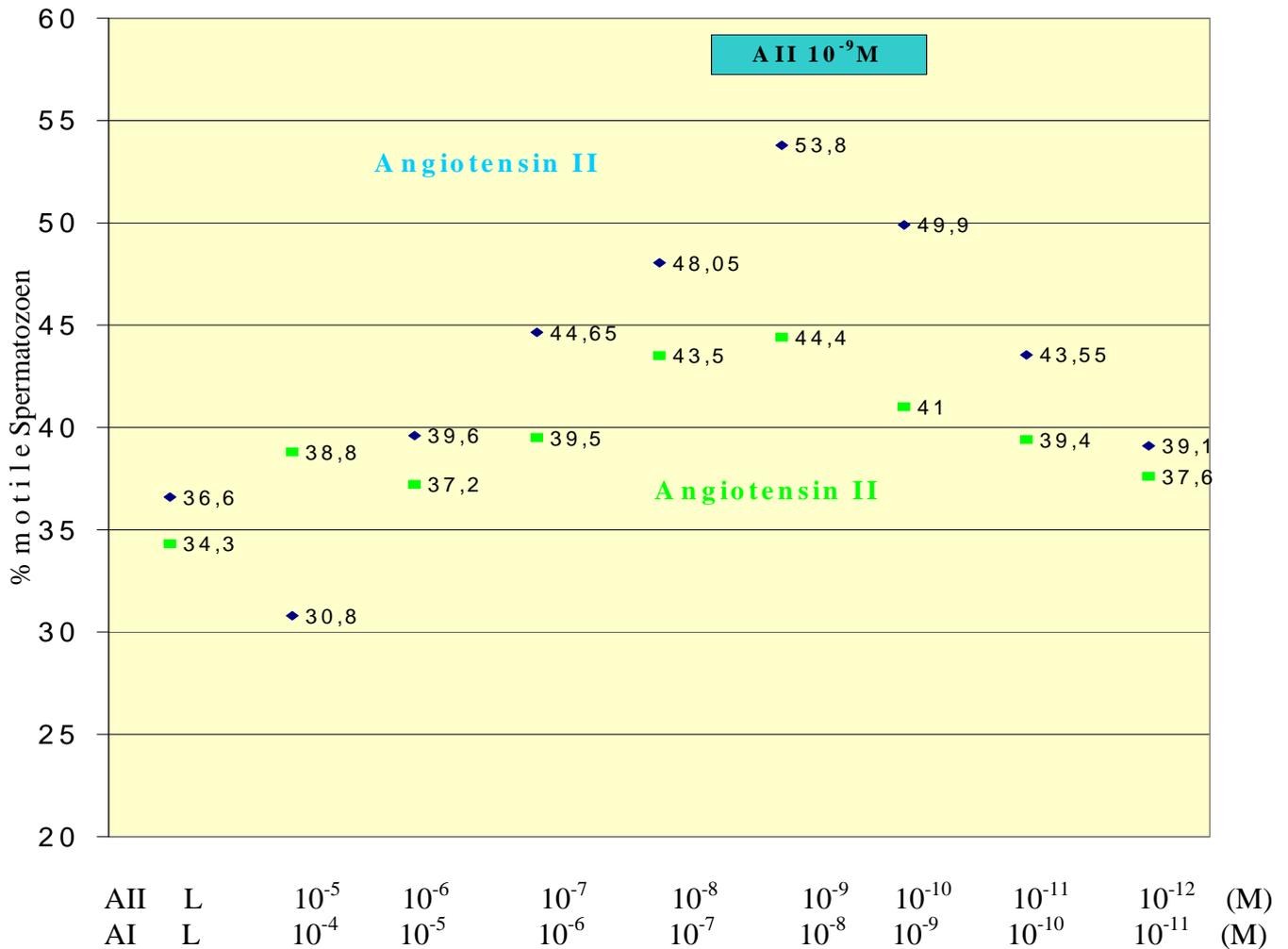


Abb. 25: Steigerung der Motilität humaner Spermatozoen durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von AI und AII. Maximum der Motilitätssteigerung bei Zusatz von AII in einer Konzentration von 10^{-9} M. L= Leerwert.

Der Hodges-Lehmann-Schätzer ist ein Schätzer für den „Mittleren Abstand“ zwischen zwei Verteilungen. Dieser Wert wird daher mit dem entsprechenden Konfidenzintervall dargestellt.

Die Werte sind dargestellt als Differenz vom Leerwert:

$$\text{Messwert} - \text{Leerwert} = \text{Wert im Graphen} = \Delta x$$

Im Folgenden werden die Ergebnisse grafisch dargestellt. An Abbildung 30 soll das System der Darstellung einführend erläutert werden:

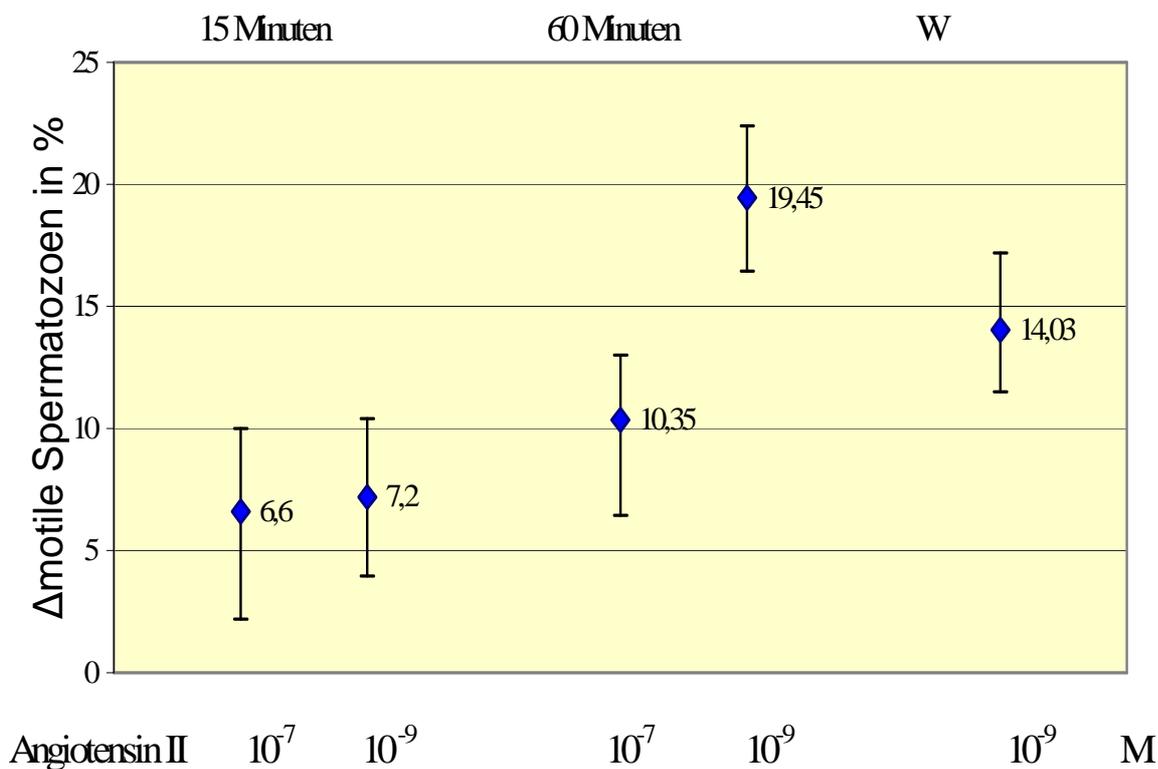


Abb. 26: Einfluss von AII auf den Anteil **motiler humaner Spermatozoen gesunder Probanden** (n=22); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

Auf der Abszisse ist die Substanzklasse links angegeben, nach rechts deren angewendete Konzentration, die Skalierung ist nominal. Auf der Ordinate erfolgt die Angabe der Prozentpunkte als Differenz vom Leerwert, wie oben beschrieben. Diese Skala ist intervallskaliert. Der Wert ist der Hodges-Lehmann-Schätzer, hier angegeben als „Δ-immotile Spermatozoen“. Zur besseren Übersicht sind die zugehörigen Wertetabellen, jeweils für Probanden und andrologische Patienten zusammengefasst, den graphischen Darstellungen jeweils vorangestellt (z.Bsp. Tabelle 8 für die Abbildungen 31 und 32).

Die Abbildungen sind, wie in Abbildung 26 gezeigt, in drei Zeitpunkte gegliedert, die mit dem jeweiligen Zeitpunkt der Messung beschriftet sind (15 Minuten, 60 Minuten, nach einem anfolgenden Waschschrift (W) in HTF-1%HSA-Medium, mit anschließender Zentrifugation bei 400xg für 10 Minuten und Resuspension in HTF-1%HSA-Medium). Der 0-Wert entspricht dem Leerwert, da die Subtraktion eines gleich großen Wertes 0 ergibt. **Die Prozentpunkte bezeichnen also den Abstand zum Leerwert.** Ein negativer Abstand bedeutet, dass der Wert kleiner ist, als die Negativkontrolle, beispielsweise als Abnahme der Immotilen in Abbildung 28. Ein positiver Wert deutet an, dass der Messwert größer ist, als die Negativkontrolle, zum Beispiel in Abbildung 26 eine Motilitätszunahme.

Durch die Art der Fragestellung und der entsprechend zu wählenden Statistik ergibt sich ein statistisch signifikantes Ergebnis aus dem Konfidenzintervall. Wenn zwei zu vergleichende Werte ein Konfidenzintervall aufweisen, das sich nicht überlappt, so gilt ein tatsächlicher, statistisch signifikanter Unterschied als erwiesen. Im Vergleich zum Leerwert ist ein Ergebnis dann signifikant, wenn die Negativkontrolle nicht im Konfidenzintervall enthalten ist. Der Wert ist dann also sicher nicht als Streuung um den Leerwert zu interpretieren, sondern weicht „signifikant“ (*im eigentlichen Sinne des Wortes und nicht als statistischer Begriff!*) von ihm ab. Die Tendenz der Werte ist ebenfalls entscheidend, da unter der explorativen Testung kein Signifikanzniveau festgelegt ist.

In Abbildung 26 ist ein Unterschied nach 15 Minuten Stimulation mit AIII in einer Konzentration von 10^{-7}M von 6,6% zum Leerwert bereits signifikant. Dagegen ist eine Zunahme motiler Spermatozoen von 10,35% nach 60 Minuten Stimulation mit AII in einer Konzentration von 10^{-7}M signifikant gegenüber dem Leerwert aber nicht signifikant gegenüber dem Wert nach 15 Minuten obwohl die Tendenz klar erkennbar ist. Diese Diskrepanz beruht auf der explorativen Testung und der Anzahl der Proben, die bei einer solchen Fragestellung nicht vorgegeben ist. Daher sollen in einer explorativen Studie auch Tendenzen berücksichtigt werden und eine Wertung nicht nur in Abhängigkeit signifikanter Ergebnisse durchgeführt werden.

4. 4. 1. Einfluss von AII (AII) auf Motilitätsparameter humaner Spermatozoen

AII ist ein Oktapeptid, das aus AI durch Abspaltung eines Dipeptids vom carboxyterminalen Ende entsteht. Im klassischen RAS erfolgt diese Abspaltung durch die Dipeptidylcarboxypeptidase ACE. AII vermittelt seine Wirkung über Angiotensin-II-Rezeptoren Typ 1 und 2 (AT1 und AT2). Wie in Kapitel 4. 1 gezeigt, lassen sich AT1-Rezeptoren im Bereich des Mittelstücks und des Flagellums nachweisen, AT2 im Bereich des Akrosoms.

AII senkt den Anteil **immotiler Spermatozoen** gesunder **Probanden** in einer Konzentration von 10^{-7}M signifikant nach 15 Minuten um 5% und nach 60 Minuten um 7% (Tab. 8, Abb. 31). In einer Konzentration von 10^{-9}M ist der Effekt nach 15 Minuten nicht signifikant. Die Abnahme immotiler Spermatozoen beträgt 3,8%, der Konfidenzintervall beträgt in die positive Richtung jedoch 4,15%, sodass der Leerwert im Konfidenzintervall liegt (siehe Abb. 32). Daher zeigt das Ergebnis keinen statistischen Unterschied zum Leerwert. Der Anteil immotiler Spermatozoen sinkt nach 60 Minuten bereits um 13,05%. Dieser Wert ist

signifikant. Keinen statistischen Unterschied kann man zwischen den beiden Konzentrationen feststellen, da sich die Konfidenzintervalle aller Messungen überschneiden (Abb. 31).

In der **Patienten**gruppe senkt AII den Anteil immotiler Spermatozoen vor allem in einer Konzentration von 10^{-9} M nach einem Waschschrift signifikant um 18,52% gegenüber dem Leerwert (Abb. 32). Das Konfidenzintervall der übrigen Werte beinhaltet den Leerwert, daher sind diese nicht signifikant. Auch der Unterschied zwischen den Konzentrationen ist nicht signifikant, da sich die Konfidenzintervalle überschneiden.

| AII | 15min | | 60min | | W |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | AII 10^{-7} | AII 10^{-9} | AII 10^{-7} | AII 10^{-9} | AII 10^{-9} |
| Probanden n=22 | -5 | -3,8 | -7 | -13,05 | -12,33 |
| KI oben | 3,75 | 4,15 | 3,6 | 3,8 | 29,18 |
| KI unten | 3,35 | 4,4 | 3,15 | 7,95 | 4,08 |
| Patienten N=17 | -4,15 | -4,7 | -6,65 | -11,3 | -18,52 |
| KI oben | 5,95 | 5,15 | 6,7 | 8,65 | 9,93 |
| KI unten | 8,55 | 4,65 | 6,7 | 17,65 | 9,92 |

Tabelle 8: Einfluss von AII in einer Konzentration von 10^{-7} und 10^{-9} M auf den Anteil (%) immotiler Spermatozoen gesunder Probanden und von andrologischen Patienten nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle in %. (n=22); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

Nach einem Waschschrift ist die Motilität in der mit AII behandelten Probe deutlich höher als in der Kontrolle. Das Ergebnis ist zudem signifikant. Der Unterschied zwischen den beiden eingesetzten Konzentrationen ist nicht signifikant, da sich die Konfidenzintervalle der entsprechenden Werte überschneiden.

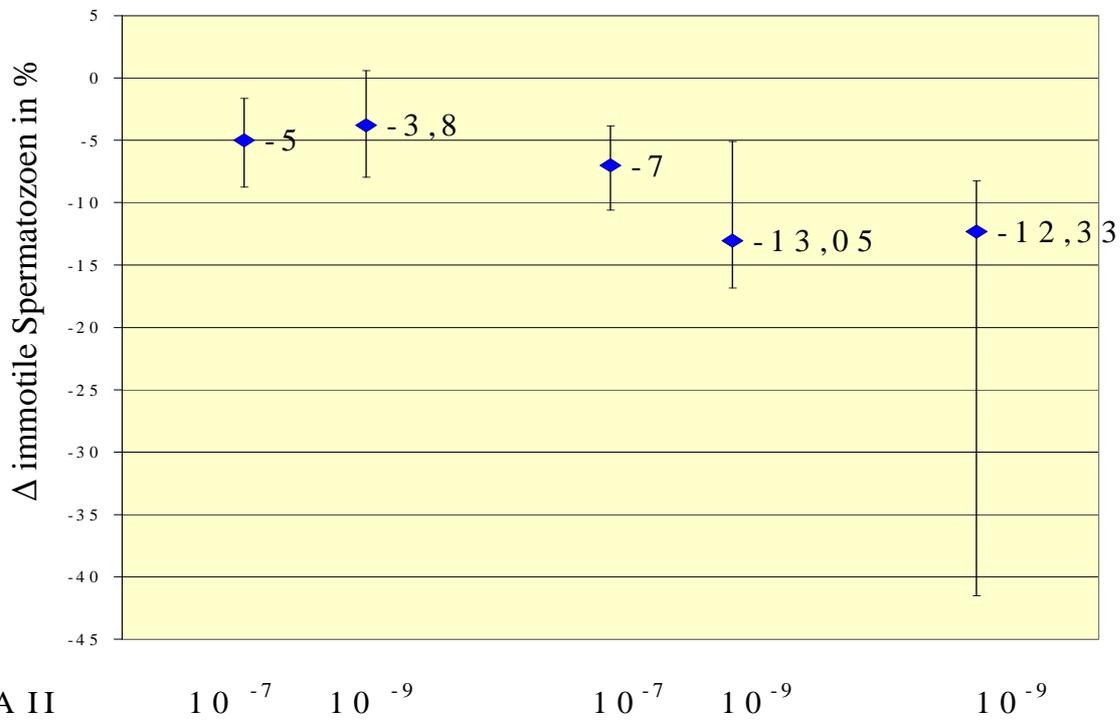


Abb. 27: Einfluss von AII nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf den Anteil **immotiler Spermatozoen gesunder Probanden** (n=22); Hodges-Lehmann schätzer +/- Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

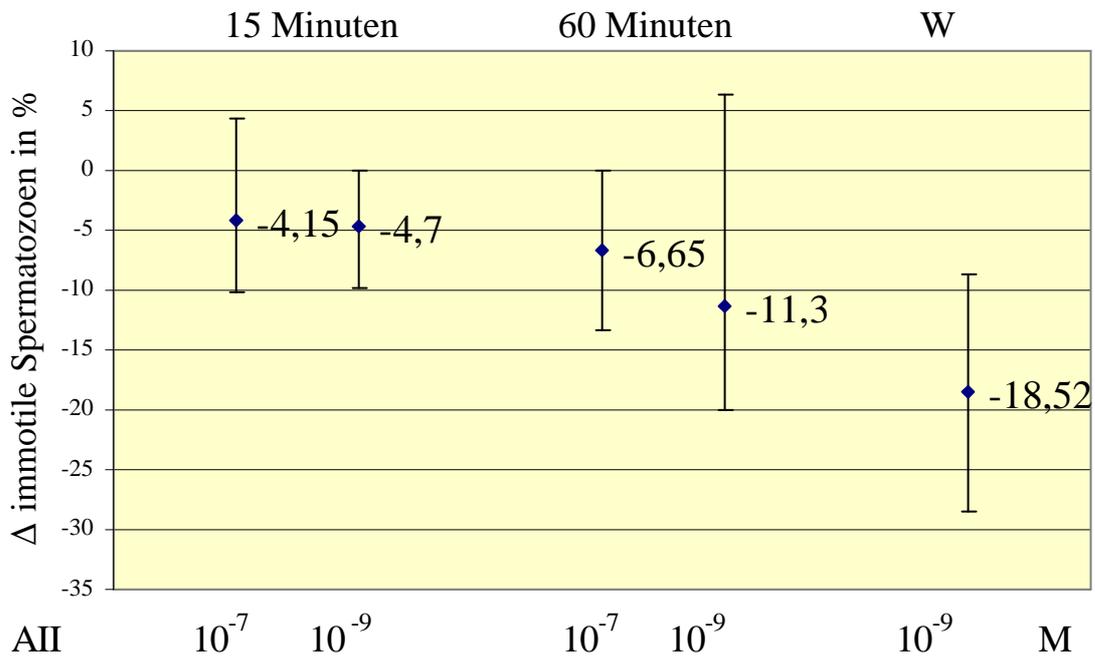


Abb. 28: Einfluss von AII nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf den Anteil **immotiler Spermatozoen von Patienten** der andrologischen Ambulanz der Universitätshautklinik Gießen (n=17); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

AII senkt den Anteil **lokal motiler Spermatozoen** in einer Konzentration von 10^{-9} M in der **Probandengruppe** nach 15 Minuten um 3,15% und nach 60 Minuten um 5,8% (Tabelle 9, Abb. 33). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Der Effekt ist nach einem Waschschrift in HTF-1%HSA nicht mehr erkennbar (Konfidenzintervall schließt Leerwert mit ein). In einer Konzentration von 10^{-7} M zeigt sich ein statistisch signifikanter Effekt erst nach 60 Minuten. Der Anteil lokal motiler Spermatozoen sinkt um 4,3%. Somit ist der Effekt geringer als unter Anwendung von AII in einer Konzentration von 10^{-9} M.

| AII | 15min | | 60min | | W |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | AII 10^{-7} | AII 10^{-9} | AII 10^{-7} | AII 10^{-9} | AII 10^{-9} |
| Probanden n=22 | -1,7 | -3,15 | -4,3 | -5,8 | -1,8 |
| KI oben | 2,55 | 1,65 | 2,8 | 2,45 | 3,2 |
| KI unten | 2,2 | 1,6 | 2,1 | 2,05 | 2,9 |
| Patienten n=17 | -2,4 | -2,15 | -4,1 | -4,7 | -3,95 |
| KI oben | 2,3 | 1,8 | 3,4 | 2,15 | 2,95 |
| KI unten | 3,25 | 2,4 | 2,85 | 4,7 | 2,25 |

*Tabelle 9: Einfluss von AII in einer Konzentration von 10^{-7} und 10^{-9} M auf den Anteil **lokal motiler Spermatozoen** gesunder Probanden und von andrologischen Patienten nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle. (n=22); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.*

Der Anteil lokal motiler Spermatozoen in der **Patientengruppe** lässt sich durch AII nach 60 Minuten Inkubationszeit unter Einsatz einer Konzentration von 10^{-7} M und 10^{-9} M senken (Abb. 34). In der Patientengruppe zeigt sich ein statistisch signifikanter Wert erst nach 60 Minuten und dies nur für AII in einer Konzentration von 10^{-7} M. AII in einer Konzentration von 10^{-9} M senkt den Anteil lokal motiler Spermatozoen nach 60 Minuten um 4,7% und somit stärker als AII in einer Konzentration von 10^{-7} M. Da der Konfidenzintervall den Leerwert jedoch einschließt, ist ein statistisch signifikanter Unterschied zum Leerwert nicht nachweisbar. Hierbei ist das Ergebnis unter Einsatz von 10^{-7} M etwas deutlicher als unter Einsatz von 10^{-9} M. Nach einem Waschschrift zeigt sich der Effekt in der Probe mit 10^{-9} M deutlicher als nach 60 Minuten. Der Anteil lokal motiler Spermatozoen ist 3,95 % geringer als im Leerwert. Der Unterschied ist hier statistisch signifikant.

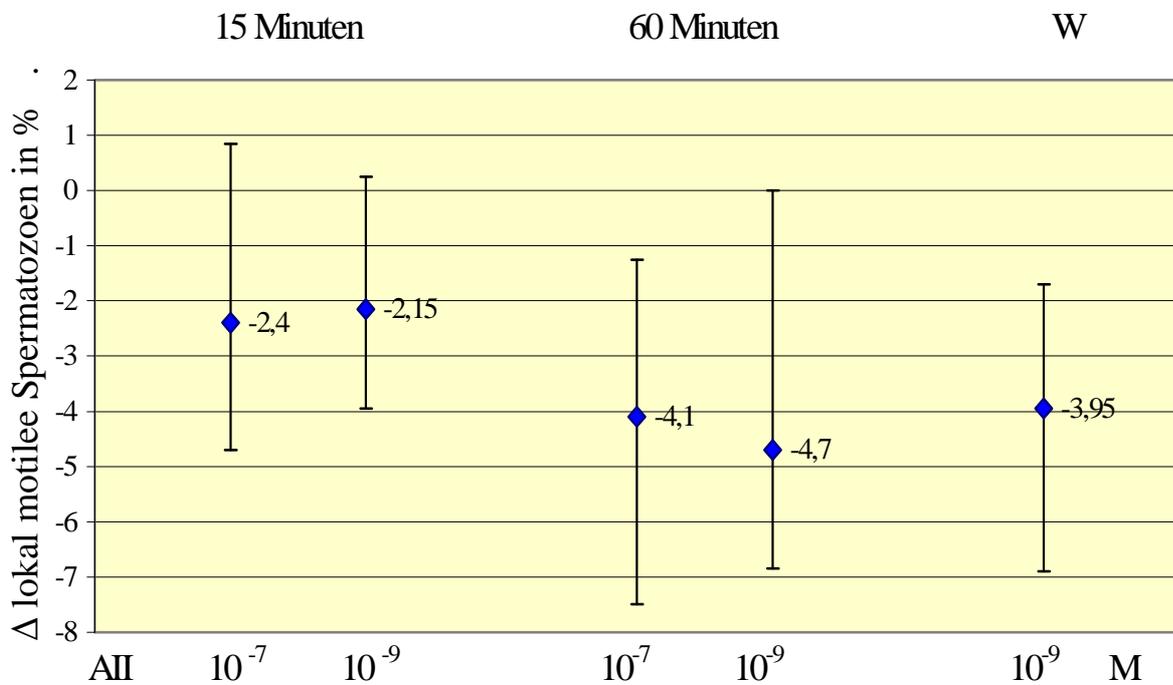


Abb. 29: Einfluss von **AII** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (**W**) auf den Anteil **lokal motiler Spermatozoen gesunder Probanden** (n=22); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

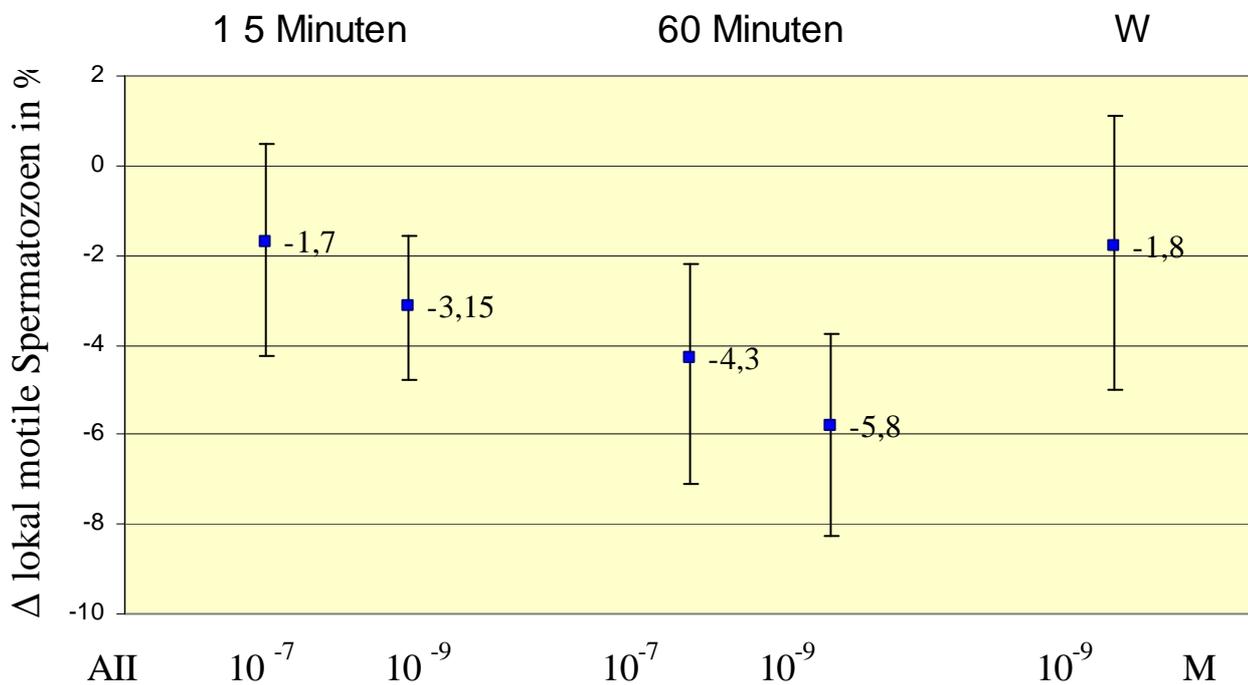


Abb. 30: Einfluss von **AII** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (**W**) auf den Anteil **lokal motiler Spermatozoen von Patienten** der andrologischen Ambulanz der Universitätshautklinik Gießen (n=17); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

Der Anteil **motiler Spermatozoen** wird durch AII bei **Probanden** und andrologischen Patienten signifikant gesteigert (Tabelle 10, Abb. 35 und 36). In der Probandengruppe lässt sich nach 15 Minuten ein signifikanter Anstieg von 6,6% unter Zusatz von 10^{-7} M und 7,2% unter Zusatz von 10^{-9} M erzielen (Abb. 35). Der Unterschied zwischen den Konzentrationen ist nicht signifikant. Nach 60 Minuten beträgt der Unterschied zum Leerwert bei Zugabe von AII 10^{-7} M 10,35%, bei Zugabe von AII 10^{-9} M 19,45%. Der Unterschied ist in beiden Fällen signifikant. Der Effekt von AII 10^{-9} ist gegenüber dem Effekt von AII 10^{-7} M ebenfalls signifikant größer, erkennbar daran, dass sich die beiden Bereiche der Konfidenzintervalle nicht überschneiden. Nach dem angeschlossenen Waschschrift in HTF-1%HSA ist der Anteil motiler Spermatozoen unter Zusatz von AII 10^{-9} M ebenfalls größer als im Leerwert. In der **Patientengruppe** steigt der Anteil motiler Spermatozoen nach 15 Minuten um 5,05% (AII 10^{-7} M) und 6,5% (AII 10^{-9} M). Dieser Unterschied zum Leerwert ist in beiden Fällen signifikant (Abb. 36). Zwischen beiden Werten gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied. Nach 60 Minuten liegt der Anteil motiler Spermatozoen um 11,75% (AII 10^{-7} M) und 14,9% (AII 10^{-9} M) über dem Leerwert. Letztgenannter Wert ist nicht signifikant. Nach einem angeschlossenen Waschschrift der Probe unter Zusatz von AII 10^{-9} M, liegt der Anteil motiler Spermatozoen deutlich (22,58%) über dem Leerwert.

| AII | 15min | | 60min | | W |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| | AII 10^{-7} | AII 10^{-9} | AII 10^{-7} | AII 10^{-9} | |
| Probanden n=22 | 6,6 | 7,2 | 10,35 | 19,45 | 14,03 |
| KI oben | 4,4 | 3,25 | 3,9 | 3 | 2,53 |
| KI unten | 3,4 | 3,2 | 2,65 | 2,95 | 3,17 |
| Patienten n=17 | 5,05 | 6,5 | 11,75 | 14,9 | 22,58 |
| KI oben | 4,25 | 3,95 | 6,45 | 16,45 | 11,5 |
| KI unten | 7,15 | 4 | 7,7 | 16,5 | 10,86 |

Tabelle 10: Einfluss von AII in einer Konzentration von 10^{-7} und 10^{-9} M auf den Anteil motiler Spermatozoen gesunder Probanden und von andrologischen Patienten nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle. (n=22); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

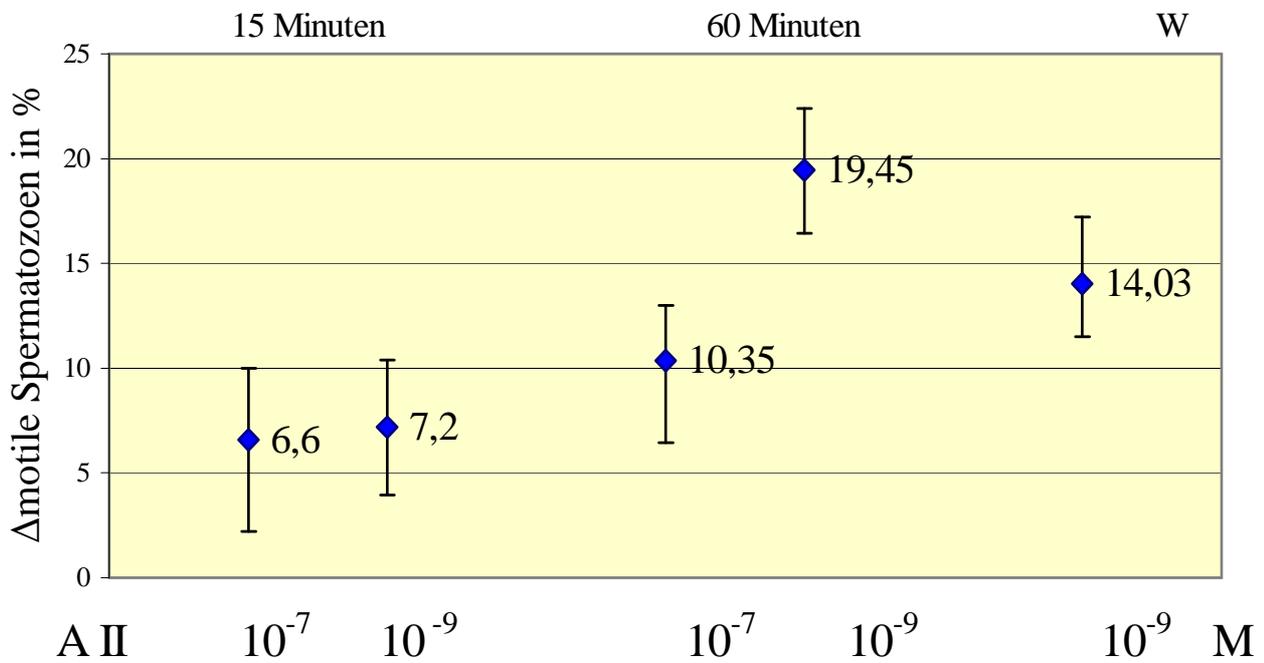


Abb. 31: Einfluss von **AII** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf den Anteil **motiler Spermatozoen gesunder Probanden** (n=22); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

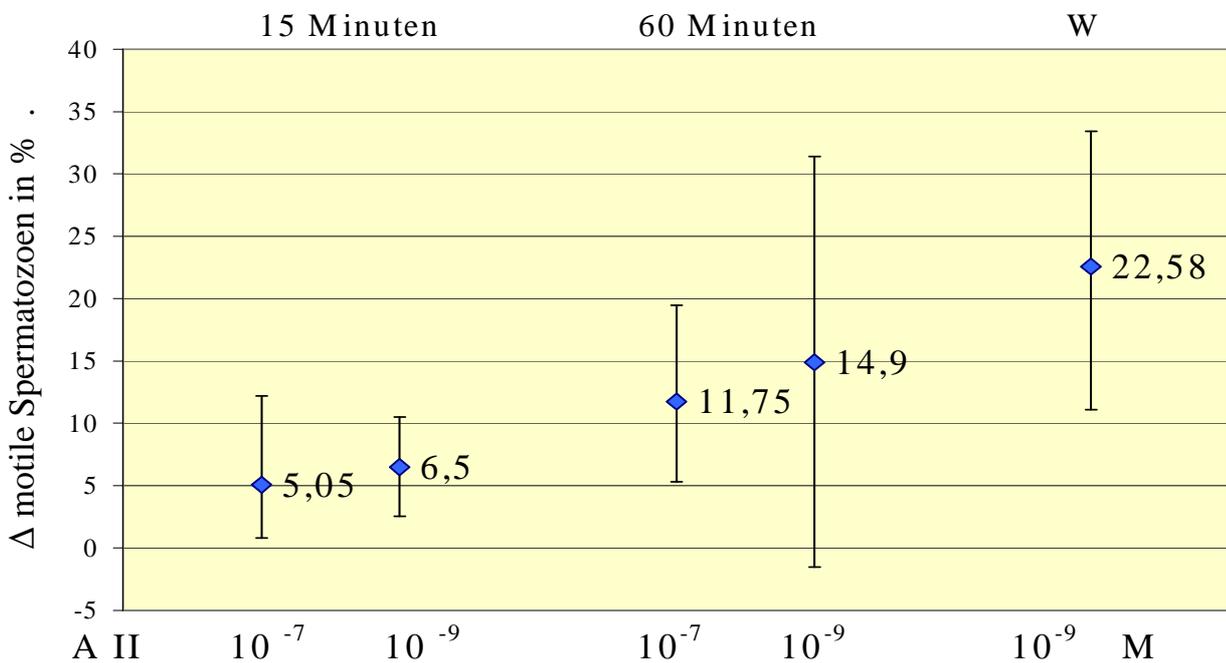


Abb. 32: Einfluss von **AII** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf den Anteil **motiler Spermatozoen von Patienten der andrologischen Ambulanz der Universitätshautklinik Gießen** (n=17); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

4. 4. 3. Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die Wirkung von AII (AII)

In diesem Versuchsaufbau wurde nach 15 Minuten, 60 Minuten und nach einem anschließenden Waschschrift in 5ml HTF-1%HSA die Progressivmotilität humaner Spermatozoen gesunder Probanden und von Patienten der andrologischen Ambulanz der Universitätsklinik Gießen bestimmt. Es wurde der Einfluss der Rezeptorantagonisten Losartan[®] (Los), Saralasin (Sar) und PD123319 (PD) gemessen. Auf der Abszisse sind die Probenbezeichnungen aufgeführt, auf der Ordinate die Prozentpunkte, um die sich der jeweilige Messwert gegenüber dem Leerwert (0-Linie) ändert. Die Messwerte (% lokal motiler, immotiler, motiler Spermatozoen in der Probe) sind dargestellt als Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall und geben die Abweichung vom Leerwert wider.

Exemplarisch für die Versuchsreihe sei anhand der Tabelle 10 und der Abbildung 37 die Darstellung der Ergebnisse erläutert:

| Losartan [®] n=10 | 15Min | | | 60Min | | | W | |
|-------------------------------|--------|------|---------|--------|------|---------|-------|---------|
| | AII | Los | AII+Los | AII | Los | AII+Los | AII | AII+Los |
| Änderung % | -12,05 | -0,2 | -2,4 | -13,85 | 2,8 | 4 | -19,2 | 1,15 |
| KI unten | 4,1 | 12,7 | 8 | 4,65 | 3,65 | 5,45 | 5,35 | 8,55 |
| KI oben | 6,55 | 7,8 | 8,2 | 5,75 | 3,4 | 4,75 | 6,45 | 6,15 |

Tabelle 11: Einfluss von Losartan[®] auf die Reduktion des Anteils immotiler Spermatozoen durch AII in einer Konzentration von 10⁻⁹M nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx= Wert in der Tabelle. (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

Es lässt sich abermals der Einfluss von AII in einer Konzentration von 10⁻⁹ M auf den Anteil **immotiler Spermatozoen** in % entnehmen: In Abbildung 37 ist die Negativkontrolle größer als der Messwert „Immotile Spermatozoen“ und die Differenz (Messwert – Leerwert) somit negativ. Dies bedeutet, dass der Anteil immotiler Spermatozoen durch AII nach 15 Minuten um 12,05% und nach 60 Minuten um 13,85% gesenkt wurde. Nach dem Waschschrift beträgt die Differenz zum Leerwert sogar 19,2%. Da das Konfidenzintervall den Leerwert nicht einschließt ist der Unterschied zum Leerwert auch statistisch erwiesen. Der mit „Los“ bezifferte Wert ist der Messwert einer Probe, welche nur mit dem Rezeptorantagonisten Losartan[®] behandelt wurde. Diese Versuche wurden mit allen Rezeptorantagonisten

durchgeführt, um den Einfluss des Pharmakons auf die Motilitätsparameter zu untersuchen. Der Messwert entspricht in Abbildung 37 in etwa dem Leerwert, die Differenz streut daher nahe um den 0-Wert. Dies deutet an, dass die Substanz (hier Losartan[®] 10⁻⁷M), keine Wirkung auf den aufgeführten Parameter hat. Der dritte Wert (AII+Los) ist das Ergebnis einer Inkubation mit dem Rezeptorantagonisten Losartan[®] und *anschließender* Zugabe von AII. Entsprechendes gilt für die Antagonisten Saralasin und PD123319.

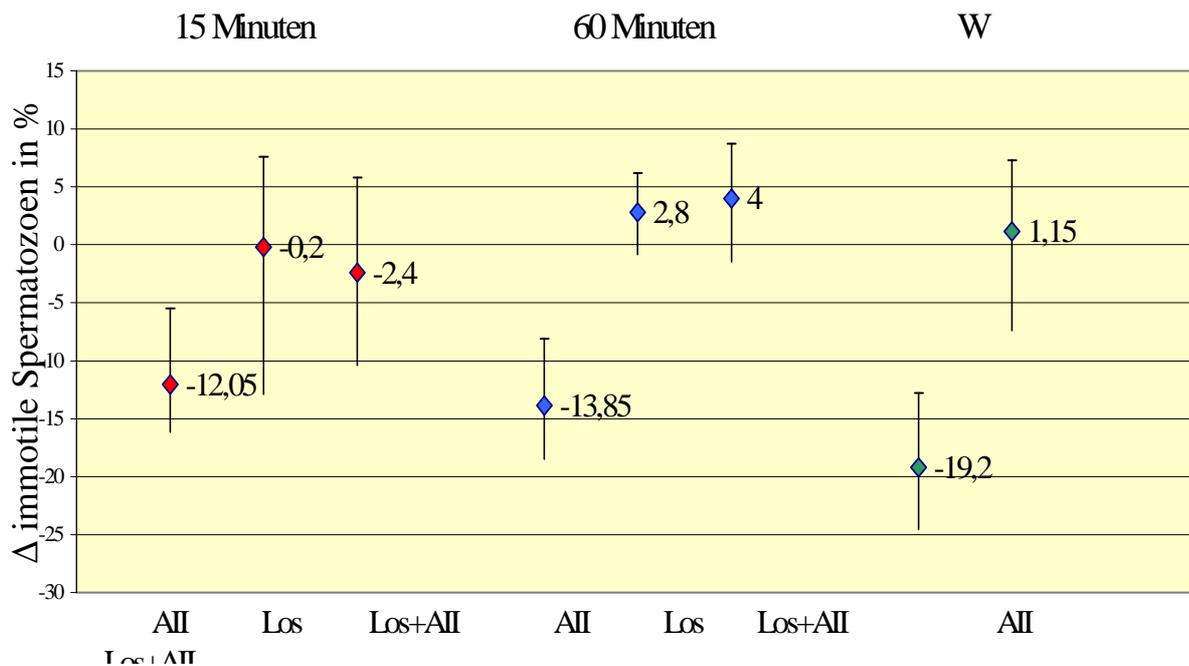


Abb. 33: Einfluss von **Losartan[®]** (Los) nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf die Reduktion des Anteils **immotiler Spermatozoen** durch AII. AII: Wirkung von AII 10⁻⁹M. Los: Wirkung von Losartan[®] ohne AII-Zugabe, Los+AII: Inkubation mit Losartan[®] vor AII-Zugabe. Spermatozoen **gesunder Probanden** (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

Losartan[®] verhindert die Abnahme des Anteils immotiler Spermatozoen durch AII in der Probe. Nach 15 Minuten zeigt sich eine Reduktion um 2,4%, die statistisch nicht signifikant war, nach 60 Minuten ist dieser Effekt noch deutlicher, es zeigt sich sogar eine Zunahme des Anteils immotiler Spermatozoen um 4%, der Wert ist allerdings ebenfalls statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz zu dem Wert nach 15 Minuten ist nach 60 Minuten der Unterschied zwischen dem Wert „AII“ und „AII+Los“ auch statistisch signifikant: Der Konfidenzintervall des Wertes „AII“ überschneidet sich nicht mit dem des Wertes Los oder Los+AII, im Gegensatz zu dem Zeitpunkt 15 Minuten. Der angeführte Waschschrift zeigt, dass auch hier

die Effekte, sobald sie einmal eingetreten sind, nicht durch Entfernen des Wirkstoffes verschwinden.

Der Anteil **lokal motiler Spermatozoen** wird durch die zugesetzten Substanzen nicht nennenswert verändert (Tabelle 12, Abb. 38). Auch hier bestätigt sich zwar die Tendenz der Abnahme des Anteils an lokal motilen Spermatozoen durch die Zugabe von AII nach 60 Minuten, wie unter 4. 4. 1. beschrieben, jedoch streuen die Werte derart, dass die Ergebnisse nicht signifikant sind. Sie streuen alle im Bereich des Leerwertes. Auch zwischen den einzelnen Werten gibt es keine signifikanten Unterschiede.

| Losartan® n=10 | 15Min | | | 60Min | | | W | |
|-------------------|-------|------|---------|-------|------|---------|-----------|---------|
| | AII | Los | AII+Los | AII | Los | AII+Los | AII | AII+Los |
| Änderung % | -2,65 | 0,95 | 2,6 | -4,6 | -2,9 | -3,65 | - 0,75 | -0,8 |
| KI unten | 4,65 | 5,7 | 5,9 | 10,2 | 5,7 | 5,85 | 4,8 | 4,75 |
| KI oben | 3,45 | 5,15 | 8,5 | 9,7 | 6 | 6,4 | 5,2 | 7 |

Tabelle 12: Einfluss von **Losartan®** auf den Effekt von AII in einer Konzentration von $10^{-9}M$ auf den Anteil **lokal motiler Spermatozoen** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle. (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

Der Anteil **motiler Spermatozoen** wird durch Zugabe von AII nach 15 Minuten um 14,25% gegenüber der Negativkontrolle gesteigert (Tabelle 13, Abb. 39). Nach 60 Minuten beträgt die Differenz 16,85% und nach einem Waschschrift 20,75% gegenüber dem Leerwert. Diese Werte sind signifikant. Unter Inkubation mit Losartan® bleibt dieser Effekt zu allen Zeitpunkten aus. Losartan® selbst hat keinen erkennbaren Effekt auf den Anteil motiler Spermatozoen. Lediglich nach dem Waschschrift in HTF-1%HSA zeigt sich eine diskrete Zunahme des Anteils motiler Spermatozoen von 2,2%, trotz Zugabe von Losartan®, die jedoch nicht signifikant ist.

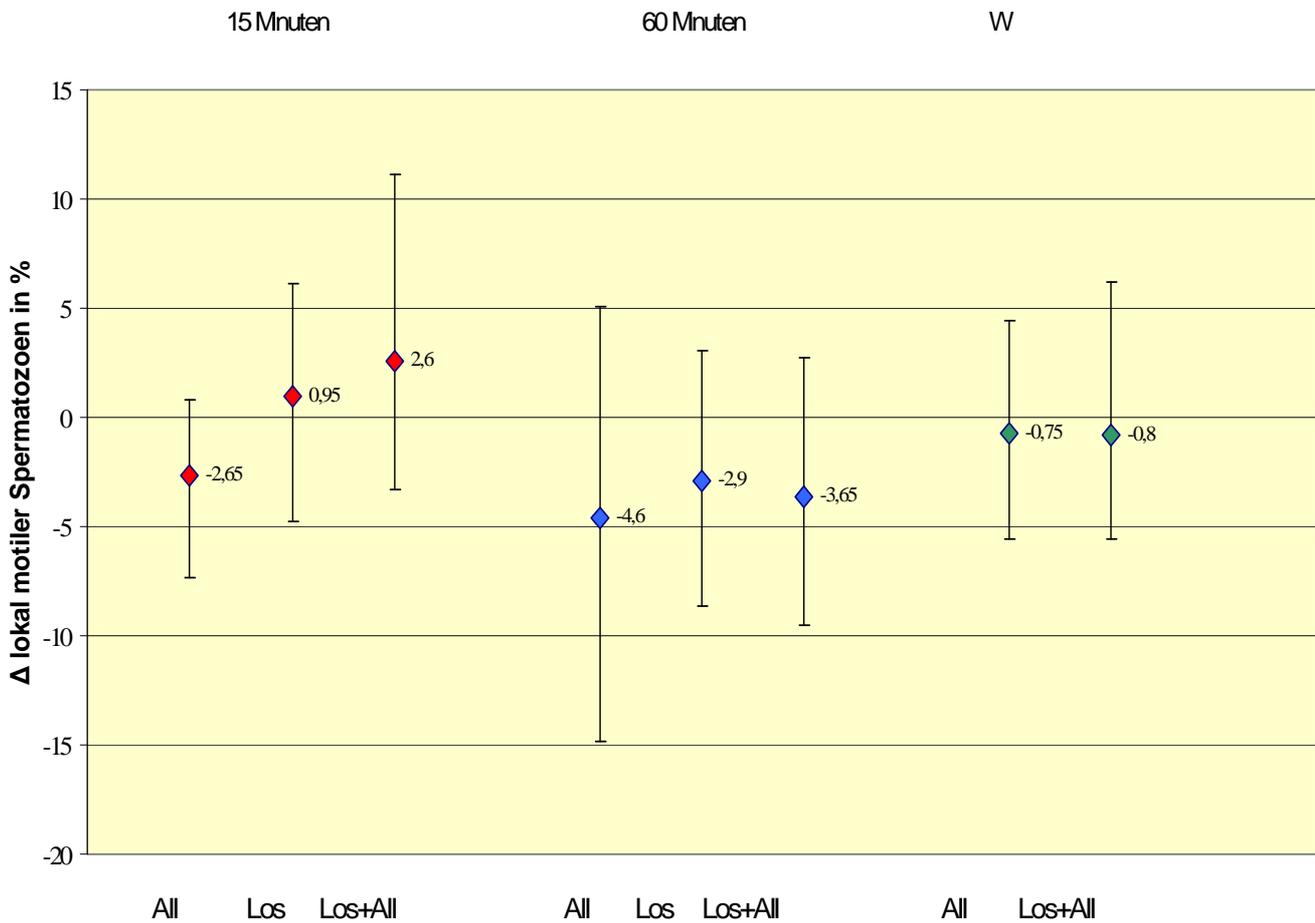


Abb. 34: Einfluss von Losartan[®] nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf die Reduktion des Anteils **lokal motiler Spermatozoen** durch AII. AII: Wirkung von AII 10⁻⁹M. Los: Wirkung von Losartan[®] ohne AII-Zugabe, Los+AII: Inkubation mit Losartan[®] vor AII-Zugabe. Spermatozoen gesunder **Probanden** (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

| Losartan [®] n=10 | 15Min | | | 60Min | | | W | |
|-------------------------------|--------------|-------------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| | AII | Los | AII+Los | AII | Los | AII+Los | AII | AII+Los |
| Änderung % | 14,25 | 0,85 | 1 | 16,85 | -1,05 | -1,75 | 20,75 | 2,2 |
| KI unten | 2,6 | 2,2 | 3,45 | 1,9 | 1,95 | 2,35 | 5,3 | 5,35 |
| KI oben | 2,3 | 3,4 | 3,95 | 2,45 | 1,65 | 2,35 | 4 | 3,4 |

Tabelle 13: Einfluss von **Losartan[®]** auf die **Motilitätssteigerung** durch AII in einer Konzentration von 10⁻⁹M nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx= Wert in der Tabelle. (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

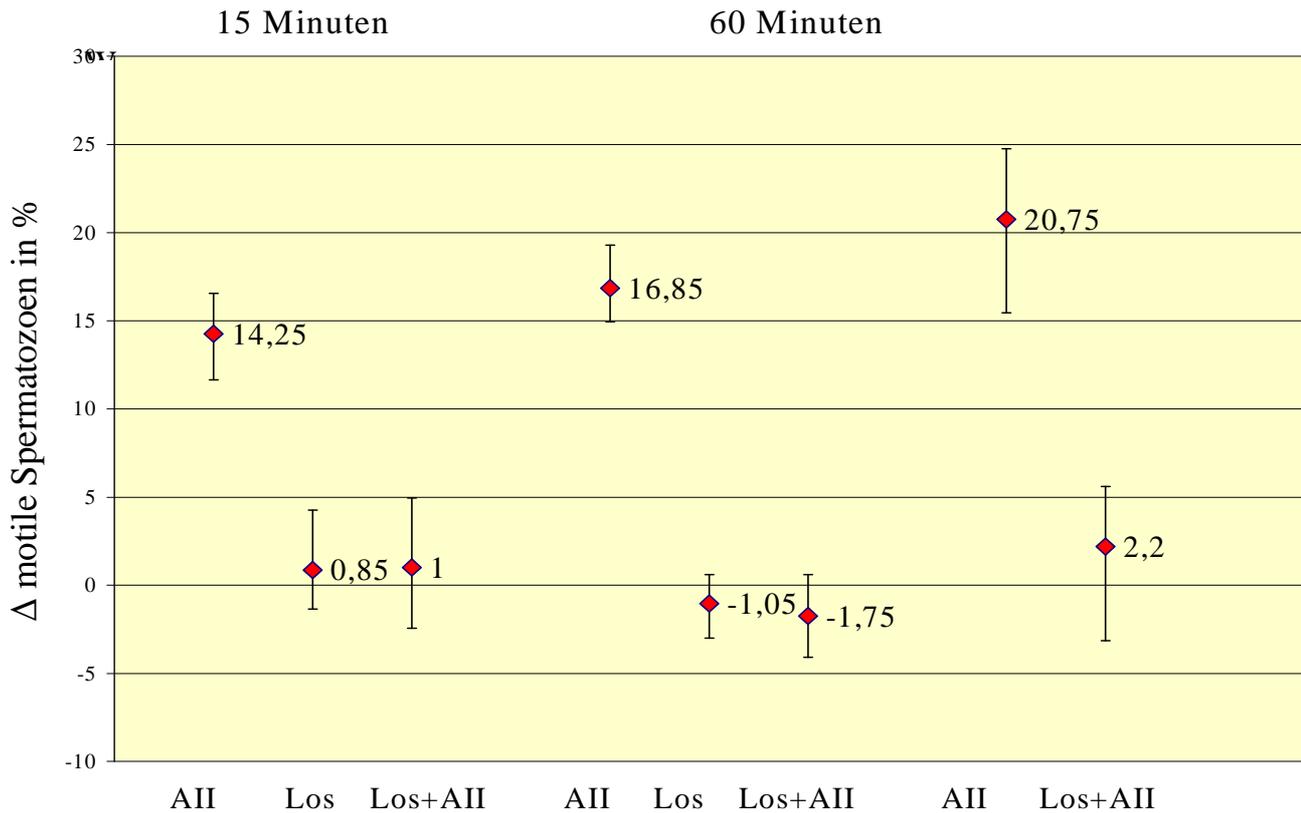


Abb. 35: Einfluss von **Losartan**[®] nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf die Steigerung des Anteils **motiler Spermatozoen** durch AII. AII: Wirkung von AII 10^9 M. Los: Wirkung von Losartan[®] ohne AII-Zugabe, Los+AII: Inkubation mit Losartan vor AII-Zugabe. Spermatozoen gesunder **Probanden** (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

Im Gegensatz zum hochspezifischen AT1-Antagonisten Losartan[®], blockiert **Saralasin** unselektiv AII-Rezeptoren, also AT1 und AT2 (Tabelle 14, Abb. 40). Der Effekt von Saralasin auf den Anteil **immotiler Spermatozoen** ist vergleichbar mit dem von Losartan[®] (Tabelle 11, Abb. 33). Die Senkung des Anteils immotiler Spermatozoen durch AII beträgt nach 15 Minuten 14,15%, sie wird durch Saralasin aufgehoben. Bemerkenswert ist allerdings eine signifikante Zunahme des Anteils immotiler Spermatozoen um 5,9% nach 60 Minuten unter Zusatz von Saralasin ohne AII.

| Saralasin n=10 | 15 Min | | | 60 Min | | | W | |
|-------------------|--------|------|----------|--------|-------|----------|--------|----------|
| | AII | Sara | AII+Sara | AII | Sara | AII+Sara | AII | AII+Sara |
| Änderung % | -14,15 | 0,15 | -1,05 | -9,55 | 5,9 | 1,95 | -18,95 | -5,5 |
| KI unten | 4,9 | 9,7 | 5 | 4,35 | 3,45 | 2,75 | 3,75 | 7,45 |
| KI oben | 6,25 | 9,3 | 8,7 | 0,725 | 22,33 | 18,88 | 6,2 | 5,6 |

Tabelle 14: Einfluss von **Saralasin** auf die Reduktion des Anteils **immotiler Spermatozoen** durch AII in einer Konzentration von $10^{-9}M$ nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle. (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

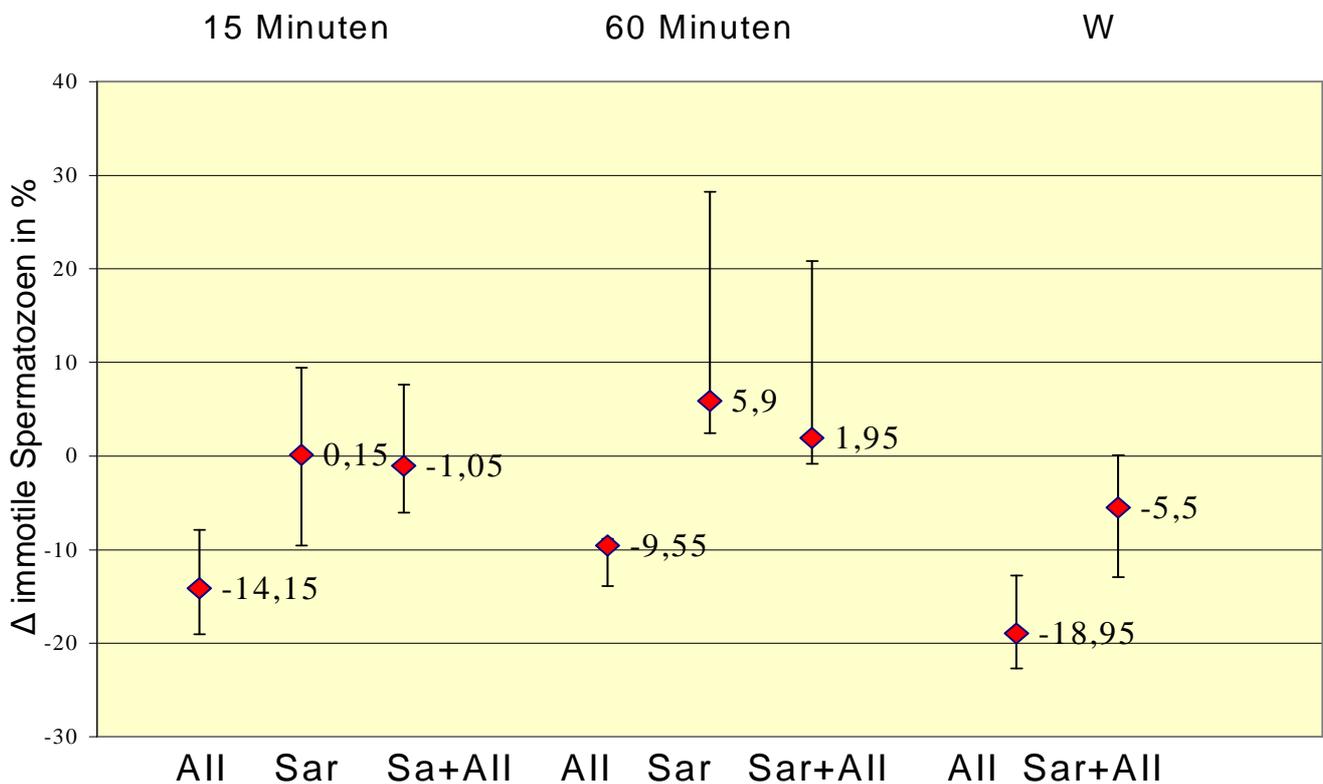


Abb. 36: Einfluss von **Saralasin** auf die Reduktion des Anteils **immotiler Spermatozoen** durch AII nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). AII: Wirkung von AII $10^{-9}M$. Sar: Wirkung von Saralasin ohne AII-Zugabe, Sar+AII: Inkubation mit Saralasin vor AII-Zugabe. Spermatozoen gesunder **Probanden** (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

Der Anteil lokal motiler Spermatozoen wird durch AII signifikant gesenkt (Tabelle 9, Abb. 29 und 30). Saralasin hemmt die Wirkung von AII (Tabelle 15, Abb. 37). In dieser Versuchsreihe zur Beurteilung des Effektes von Saralasin auf die Senkung des Anteils lokal motiler Spermatozoen durch AII zeigt AII keinen signifikanten Effekt. Die Probandenzahl in beiden Fällen war allerdings nicht gleich. Der Anteil lokal motiler Spermatozoen ist jedoch unter Saralasinzusatz vor AII- Inkubation tendenziell geringer als unter Losartan[®]-Zugabe. Dies bedeutet, dass AII seine Wirkung, den Anteil lokal motiler Spermatozoen zu senken, unter Saralasinzugabe stärker ausüben kann, als unter Losartan[®]-Zusatz (Vergleiche Tabelle 12, Abb. 34).

Saralasin hemmt die motilitätssteigernde Wirkung von AII (Abb. 38). Dieser Effekt ist nach 15 Minuten genauso ausgeprägt wie unter Zugabe von Losartan[®]. Nach 60 Minuten zeigt sich jedoch eine signifikante Zunahme der Motilität von 2,95%, die unter Losartan[®]-Zugabe nicht auftritt (Tabelle 13, Abb. 35).

| SARALASIN N=10 | 15MIN | | | 60MIN | | | W | |
|-------------------|-------|-------|----------|-------|------|----------|-------|----------|
| | AII | Sara | AII+Sara | AII | Sara | AII+Sara | AII | AII+Sara |
| Änderung % | -2,8 | -1,45 | -0,4 | -2,45 | -2,8 | -2,1 | -0,75 | -0,95 |
| KI unten | 4,5 | 4,85 | 9,6 | 5,35 | 6,2 | 4,8 | 4,8 | 4,25 |
| KI oben | 3,6 | 5,75 | 4,5 | 3,95 | 3,75 | 4,05 | 5,2 | 4,15 |

Tabelle 15: Einfluss von Saralasin auf den Effekt von AII in einer Konzentration von 10⁻⁹M auf den Anteil lokal motiler Spermatozoen nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx= Wert in der Tabelle. (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

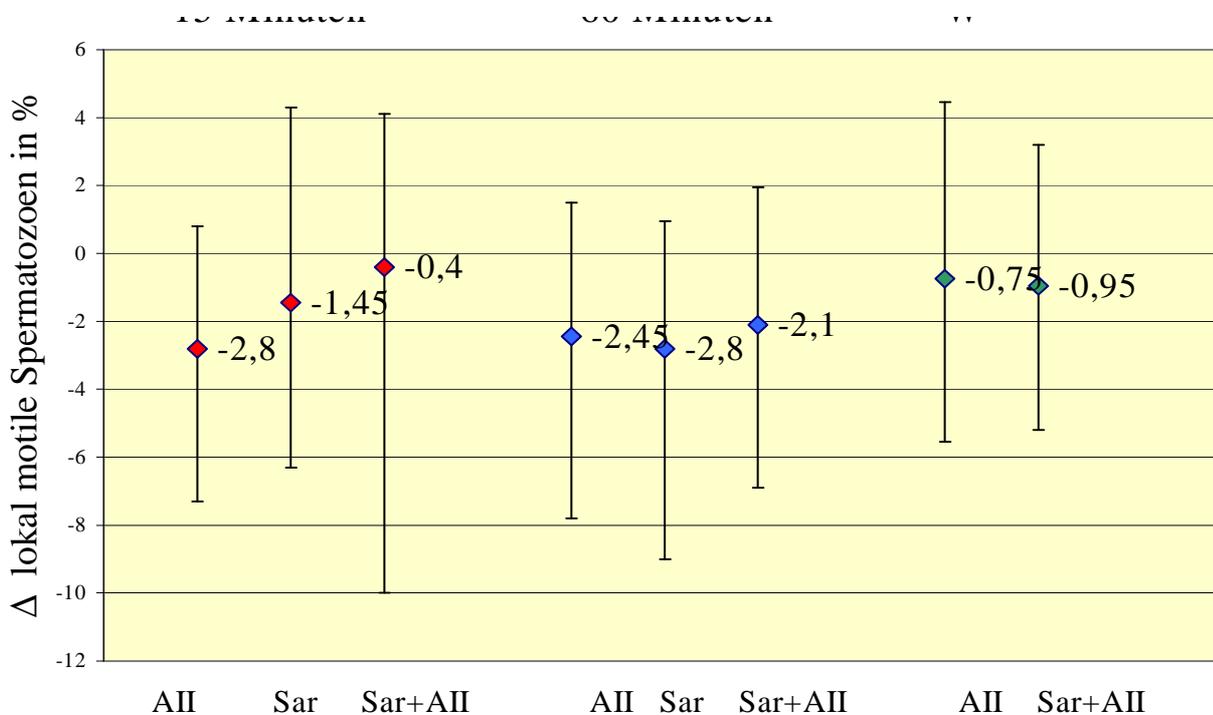


Abb. 37: Einfluss von **Saralasin** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf die Reduktion des Anteils **lokal motiler Spermatozoen** durch AII. AII: Wirkung von AII $10^{-9}M$, Sar: Wirkung von Saralasin ohne AII-Zugabe, Sar+AII: Inkubation mit Saralasin vor AII-Zugabe. Spermatozoen **gesunder Probanden** ($n=10$); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall

Nach dem Waschschrift in HTF 1%HSA beträgt die Motilitätssteigerung sogar 19,0%. Saralasin hemmt den Effekt von AII nach einer Stunde somit nicht mehr. Im Gegensatz dazu wird der motilitätssteigernde Effekt von AII durch Losartan[®] komplett gehemmt (Abb. 35).

| Saralasin <i>n=10</i> | 15Min | | | 60Min | | | W | |
|---------------------------------|------------|-------------|-----------------|------------|-------------|-----------------|------------|-----------------|
| | AII | Sara | AII+Sara | AII | Sara | AII+Sara | AII | AII+Sara |
| Änderung % | 15,1 | 1,45 | 0,4 | 17,2 | -0,75 | 2,95 | 18,2 | 19 |
| KI unten | 2,9 | 3,85 | 5,9 | 2,5 | 2,6 | 2,3 | 3,45 | 15 |
| KI oben | 2,1 | 3,45 | 4,55 | 1,15 | 2,9 | 2,75 | 5,85 | 14 |

Tabelle 16: Einfluss von **Saralasin** auf die **Motilitätssteigerung** durch AII in einer Konzentration von $10^{-9}M$ nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle. ($n=10$); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

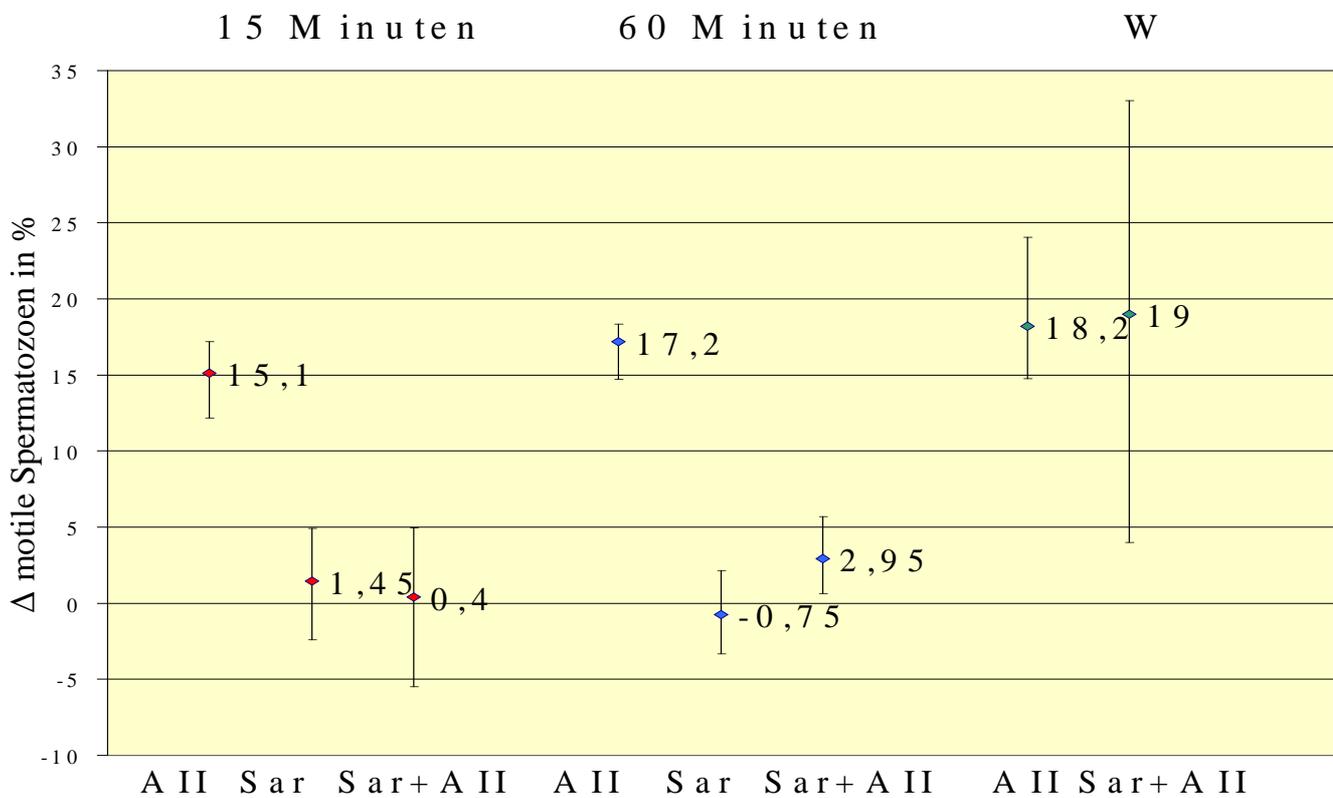


Abb. 38: Einfluss von **Saralasin** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf die Steigerung des Anteils **motiler Spermatozoen** durch AII. AII: Wirkung von AII $10^{-9}M$, Sar: Wirkung von Saralasin ohne AII-Zugabe, Sar+AII: Inkubation mit Saralasin vor AII-Zugabe Spermatozoen gesunder **Probanden** ($n=10$); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

PD123319 ist ein spezifischer AT₂-Antagonist. Der Einfluss von AII auf den Anteil immotiler Spermatozoen wird durch PD123319 nicht verändert (Abb. 39). Der Anteil immotiler Spermatozoen wird durch AII gesenkt (Tabelle 8, Abb. 27 und 28). PD123319 beeinflusst diesen Effekt nicht signifikant (Tabelle 17, Abb. 39). Dennoch zeigt sich eine tendenzielle Abnahme des Anteils immotiler Spermatozoen gegenüber dem Kontrollwert unter Zusatz von AII. Unter Zugabe von AII sinkt der Anteil immotiler Spermatozoen um 12,75%. Die Inkubation mit PD123319 führt lediglich zu einer Reduktion des Anteils immotiler Spermatozoen durch AII von 8,85% nach 15 Minuten und 7,2% nach einer Stunde. Nach dem Waschschrift in HTF 1%HSA zeigt sich ebenfalls ein Unterschied. Während unter Zusatz von AII der Anteil immotiler Spermatozoen 18,95% unter dem Leerwert liegt, sind es bei Vorinkubation mit PD123319 14,8%. Der Anteil motiler Spermatozoen wird durch AII gesteigert (Tabelle 10, Abb. 31 und 32). PD123319 konnte diesen Effekt nicht signifikant verhindern (Tabelle 19, Abb. 41). Tendenziell war der Anteil motiler Spermatozoen jedoch unter Vorinkubation mit PD123319 geringer als unter Zugabe von AII alleine. Während AII

zu einer Zunahme um 15,1% führt, nimmt unter Zugabe von PD123319 der Anteil motiler Spermatozoen lediglich um 11,6% zu. Dabei ist dieser Wert auf Grund der ausgeprägten Streuung auch nicht signifikant zum Leerwert. Nach einer Stunde führt AII zu einer Steigerung der Motilität um 17,2%. Unter Zugabe von PD123319 liegt die Zunahme unter AII bei 14,15%.

| PD123319 n=10 | 15Min | | | 60Min | | | W | |
|--------------------------|------------|-----------|---------------|------------|-----------|---------------|------------|---------------|
| | AII | PD | AII+PD | AII | PD | AII+PD | AII | AII+PD |
| Änderung % | -12,75 | -0,55 | -8,85 | -13,85 | 4,3 | -7,2 | -18,95 | -14,8 |
| KI unten | 3,8 | 4,45 | 6,7 | 4,3 | 3,5 | 8,1 | 3,75 | 4,3 |
| KI oben | 7,25 | 5,6 | 5,95 | 5,75 | 2,95 | 3,9 | 6,2 | 8,05 |

Tabelle 17: Einfluss von PD123319 auf die Reduktion des Anteils immotiler Spermatozoen durch AII in einer Konzentration von $10^{-9}M$ nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle. (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

Nach einem Waschschrift in HTF 1%HSA liegt der Anteil motiler Spermatozoen unter Zusatz von AII 18,2% höher als beim Leerwert. Unter Zugabe von PD123319 liegt der Anteil motiler Spermatozoen ebenfalls höher als beim Leewert, jedoch mit 15,4%, 2,8% unter dem Wert von AII alleine.

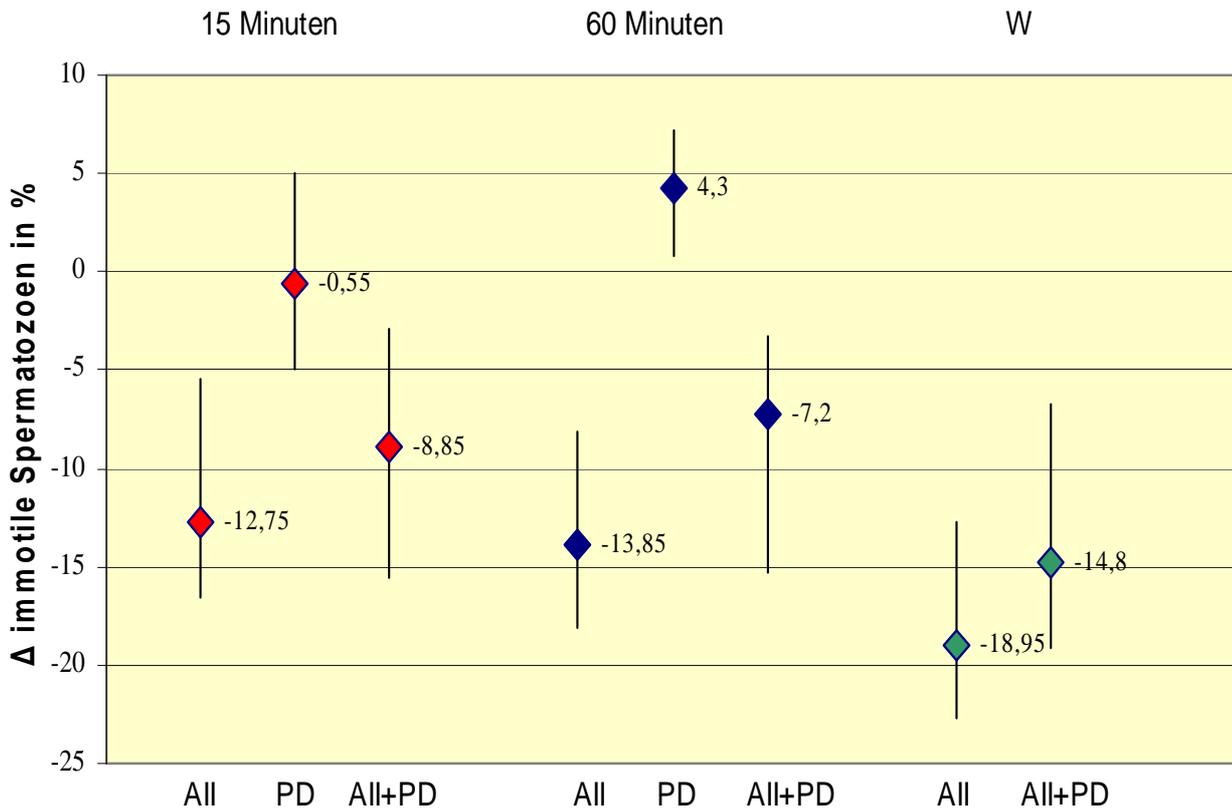


Abb. 39: Einfluss von **PD123319** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf die Reduktion des Anteils **immotiler Spermatozoen** durch AII. AII: Wirkung von AII $10^{-9}M$, PD: Wirkung von PD123319 ohne AII-Zugabe, PD+AII: Inkubation mit von PD123319 vor AII-Zugabe. Spermatozoen gesunder Probanden ($n=10$); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

| PD123319 N=10 | 15Min | | | 60Min | | | W | |
|--------------------------------|------------|-----------|---------------|------------|-----------|---------------|------------|---------------|
| | AII | PD | AII+PD | AII | PD | AII+PD | AII | AII+PD |
| Änderung % | -2,8 | -0,9 | -4,05 | -2,45 | -2,8 | -5,7 | -0,75 | 0 |
| KI unten | 4,5 | 5,7 | 3,05 | 5,35 | 3,1 | 3,35 | 4,8 | -5,8 |
| KI oben | 3,6 | 4,25 | 5,6 | 3,95 | 3,2 | 7,4 | 5,2 | 5,9 |

Tabelle 18: Einfluss von **PD123319** auf den Effekt von AII in einer Konzentration von $10^{-9}M$ auf den Anteil **lokal motiler Spermatozoen** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle. ($n=10$); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

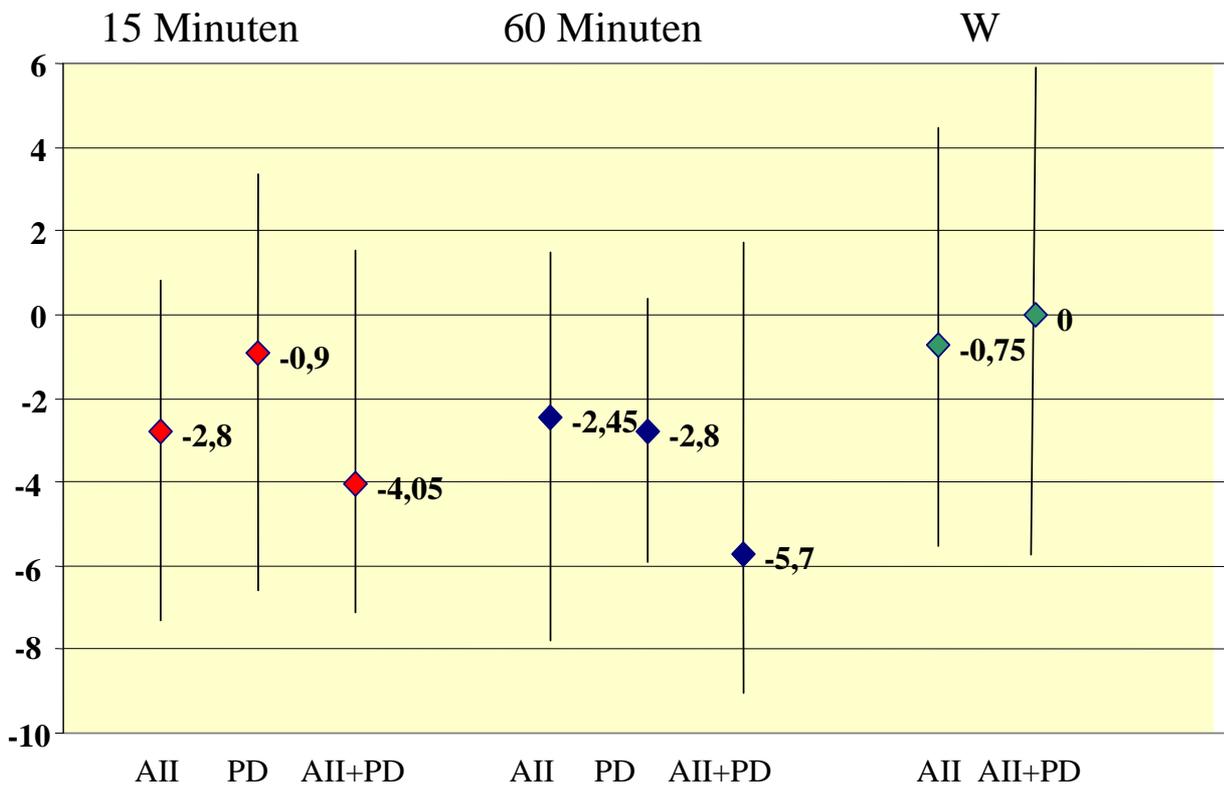


Abb. 40: Einfluss von **PD123319** nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf die Reduktion des Anteils **lokal motiler Spermatozoen** durch AII. AII: Wirkung von AII $10^{-9}M$, PD: Wirkung von PD123319 ohne AII-Zugabe, PD+AII: Inkubation mit von PD123319 vor AII-Zugabe. Spermatozoen **gesunder Probanden** ($n=10$); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

| PD123319 N=10 | 15Min | | | 60Min | | | W | |
|--------------------------------|------------|-----------|---------------|------------|-----------|---------------|------------|---------------|
| | AII | PD | AII+PD | AII | PD | AII+PD | AII | AII+PD |
| Änderung % | 15,1 | 1,4 | 11,6 | 17,2 | -0,55 | 14,15 | 18,2 | 15,4 |
| KI unten | 2,9 | 1,9 | 12,55 | 1,5 | 1,4 | 2,7 | 3,45 | 3,2 |
| KI oben | 2,1 | 1,6 | 3,65 | 1,15 | 1,3 | 2 | 5,85 | 3,7 |

Tabelle 19: Einfluss von **PD123319** auf die **Motilitätssteigerung** durch AII in einer Konzentration von $10^{-9}M$ nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle. ($n=10$); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

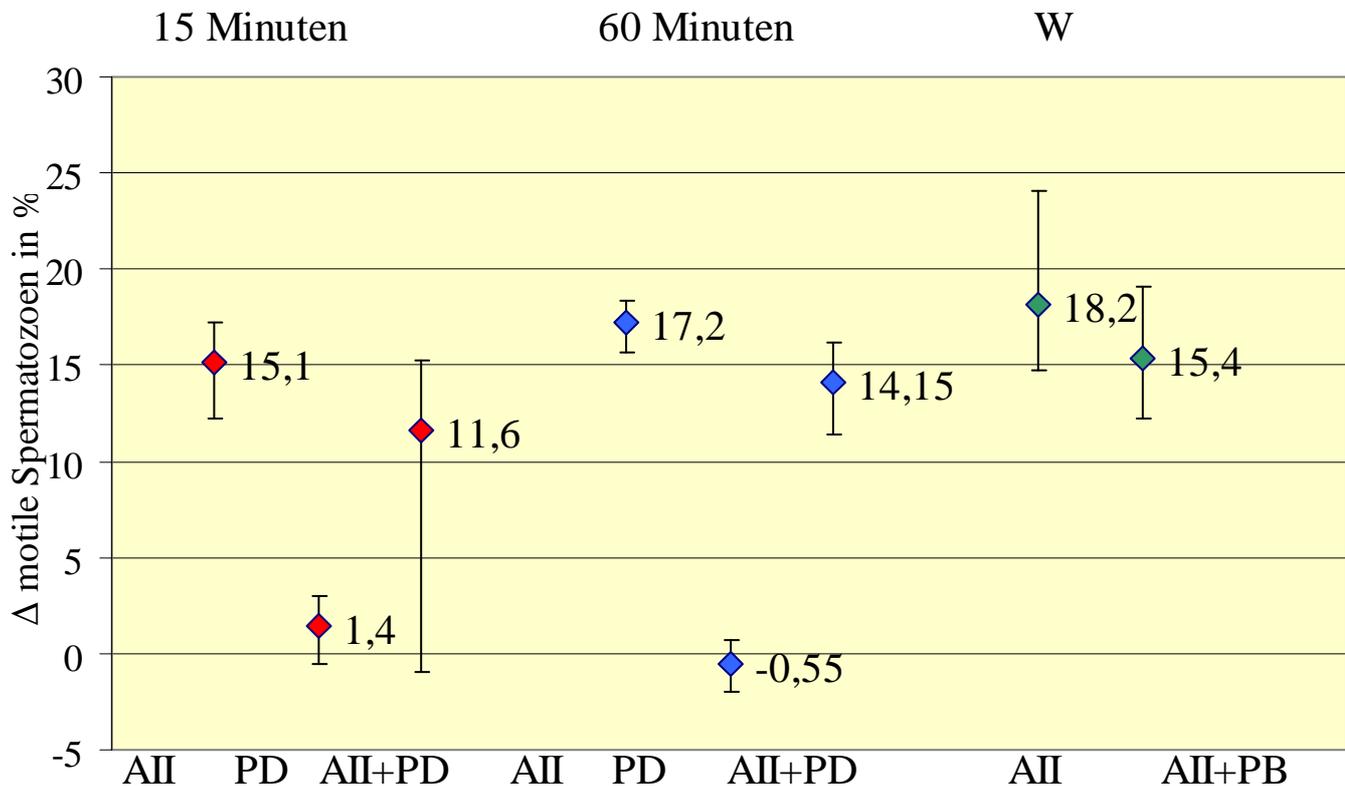


Abb. 41: Einfluss von PD123319 nach 15 und 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W) auf die Steigerung des Anteils motiler Spermatozoen durch AII. AII: Wirkung von AII 10^9 M, PD: Wirkung von PD123319 ohne AII-Zugabe, PD+AII: Inkubation mit von PD123319 vor AII-Zugabe. Spermatozoen gesunder Probanden (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

Der Vergleich der drei Rezeptorantagonisten Losartan[®], Saralasin und PD123319 untereinander in Bezug auf die Motilitätssteigerung durch AII zeigt, dass Losartan[®] und Saralasin, nicht jedoch PD123319 den motilitätssteigernden Effekt von AII aufheben können (Tabelle 20, Abb. 42). Nach einer Stunde liegt der Wert im Bereich des Leerwertes, während AII alleine zu einem Anstieg des Anteils motiler Spermatozoen gegenüber dem Leerwert, um 16,85% geführt hat. Saralasin führt ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion des Anstiegs des Anteils motiler Spermatozoen durch AII. Mit einem Anstieg von 2,95% gegenüber dem Leerwert, ist der Unterschied allerdings signifikant, sodass Saralasin den Anstieg motiler Spermatozoen durch AII nicht vollständig inhibieren konnte. PD123319 kann den Effekt von AII nicht signifikant senken. Der Anteil motiler Spermatozoen liegt 14,15% über dem Leerwert.

| 60min | AII | AII + Los | AII + Sar | AII + PD |
|-------------------|-------|-----------|-----------|----------|
| Änderung % | 16,85 | -1,75 | 2,95 | 14,15 |
| KI unten | 2,45 | 2,35 | 2,75 | 2 |
| KI oben | 1,9 | 2,35 | 2,3 | 2,7 |

Tabelle 20: Vergleich der drei Rezeptorantagonisten **Losartan**[®], **Saralasin** und **PD123319** auf die **Motilitätssteigerung** durch AII in einer Konzentration von $10^{-9}M$ nach 60 Minuten Inkubation sowie nach einem Waschschrift (W). Gezeigt ist die Abweichung vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle. (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/- Konfidenzintervall (KI), (oberer bzw. unterer Wert des KI, ausgehend vom Schätzwert), modifizierter Wilcoxon-Test.

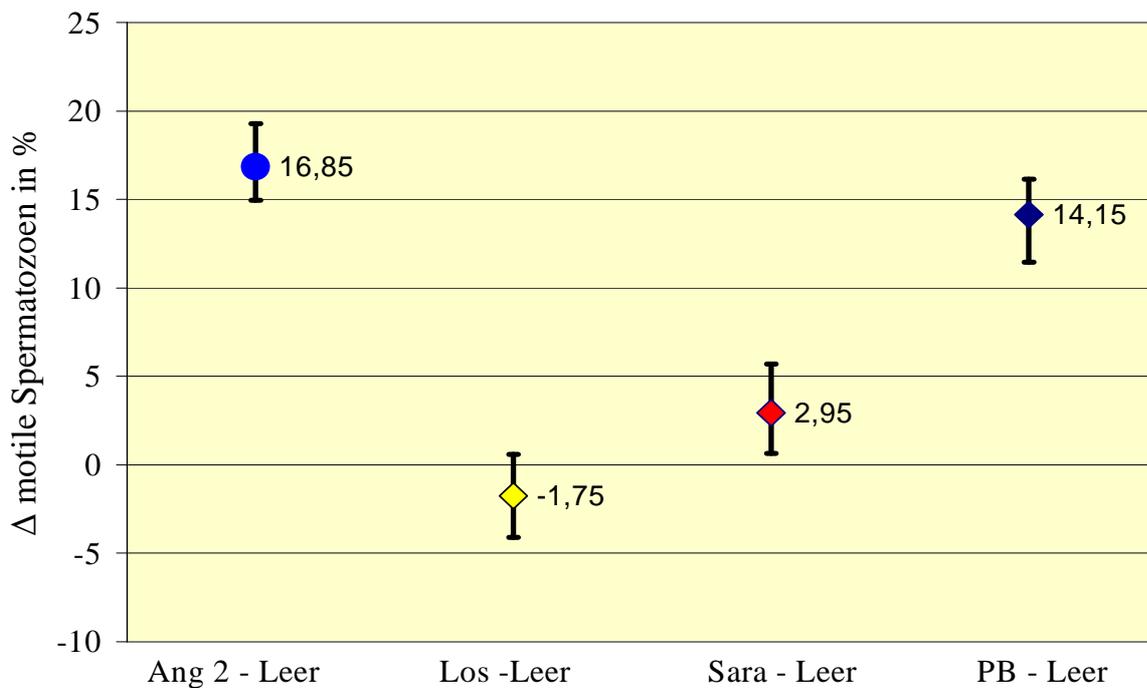


Abb. 42: Einfluss von **Losartan**[®], **Saralasin** und **PD123319** (je $10^{-7}M$) auf die Steigerung des Anteils **motiler Spermatozoen** durch AII ($10^{-9}M$) nach 60 Minuten. Spermatozoen gesunder Probanden (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer +/-Konfidenzintervall, modifizierter Wilcoxon-Test.

5. Diskussion

5. 1. Einleitung

Zunächst erfolgt ein kurzer Überblick über bisherige Forschungsergebnisse (5. 1. 1). AII entsteht aus AI durch die Wirkung von ACE, daher wird im Anschluss die Bedeutung von ACE für die Spermatozoenfunktion diskutiert (5. 1 2.).

Unter 5. 2. erfolgt die eigentliche Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit wie folgt: Die Motilitätssteigerung wird durch AII hervorgerufen, als zweites folgt somit die Diskussion der Relevanz von AII für die Funktion von Spermatozoen (5. 2.). Die Wirkung von AII wird über AII-Rezeptoren vermittelt (AT1 und AT2), anschließend folgt daher die Diskussion der AT auf Spermatozoen (5. 3.). Weiterhin wird auf die Effekte, die AII über die beschriebenen Rezeptoren auf humanen Spermatozoen vermittelt, eingegangen (5. 4.). Zum Abschluss werden die wichtigsten Schlussfolgerungen zusammengefasst (5. 5.):

| | |
|--------------|---|
| 5. 1. | <u>Einleitung</u> |
| 5. 1. 1. | Überblick bisheriger Forschungsergebnisse über das RAS im männlichen Reproduktionstrakt (S. 96) |
| 5. 1. 2. | Relevanz von ACE für die Spermatozoenfunktion (S. 100) |
| 5. 2. | <u>Diskussion der Ergebnisse</u> |
| 5. 2. 1. | -AII in humanem Seminalplasma (S. 104) |
| 5. 2. 1. 1. | -Eigene Ergebnisse (S. 104) |
| 5. 2. 1. 2. | -Literatur (S. 105) |
| 5. 2. 1. 3. | -Vergleich und Diskussion der Ergebnisse (S. 107) |
| 5. 2. 1. 4. | -Bewertung (S. 110) |
| 5. 2. 2. A | -AII-Rezeptoren auf humanen Spermatozoen (S. 113) |
| 5. 2. 1. 1. | -Eigene Ergebnisse (S. 113) |
| 5. 2. 1. 2. | -Literatur (S. 115) |
| 5. 2. 1. 3. | -Vergleich und Diskussion der Ergebnisse (S. 118) |
| 5. 2. 1. 4. | -Bewertung (S. 121) |
| 5. 2. 3. | -Einfluss von AII auf die Motilität humaner Spermatozoen (S. 122) |
| 5. 2. 3. 1. | -Eigene Ergebnisse (S. 122) |
| 5. 2. 3. 2. | -Literatur (S. 127) |
| 5. 2. 3. 3. | -Vergleich und Diskussion der Ergebnisse (S. 128) |
| 5. 2. 3. 4. | -Bewertung (S. 132) |
| 5. 3. | <u>Schlussfolgerung und abschließende Bewertung (S. 134)</u> |

5. 1. 1. Überblick bisheriger Forschungsergebnisse über das RAS im männlichen Reproduktionstrakt

Klassischerweise wird das **RAS** mit der Blutdruckregulation in Verbindung gebracht (siehe Kapitel 1.4., Vallotton, 1987; Vinson et al., 1995a). Es ist neben vielen komplexen Stoffwechselprozessen, wie der Apoptose im fetalen Organismus sowie in pathologisch verändertem Gewebe und dem Remodelling nach Myokardinfarkt, vor allem an der kurz- und mittelfristigen Blutdruckregulation beteiligt (Knox & Granger 1987, Sabolic & Brown 1995). Die Präsenz des **RAS im männlichen Reproduktionstrakt** wurde bereits mehrfach beschrieben (siehe Tabelle 21, S. 96; Kapitel 1. 3.; Deschepper et al., 1986; Soubrier & Corvol, 1990; Dostal et al., 1992; Mulrow, 1992; Phillips et al., 1993; Hagemann et al., 1994). Membrangebundenes ACE wurde zudem auf humanen Spermatozoen nachgewiesen (Köhn et al., 1998a).

Auch im **weiblichen Reproduktionstrakt** gibt es zahlreiche Hinweise auf ein funktionierendes lokales RAS (Culler et al., 1986, Hsueh, 1988; Jarry et al., 1988, Sealey & Jentsch et al., 1989, Rubattu, 1989; Hagemann et al., 1994; Heimler et al., 1995, Vinson et al., 1997). Es ließ sich entsprechend die RNA und die Produktion von Prorenin, Renin und ACE im Ovar nachweisen (Derckx et al., 1987; Itskovitz & Sealey, 1987; Bumpus et al., 1988; Metzger et al., 1988). Während des Eisprunges ließ sich eine erhöhte Konzentration von AII in der Peritonealflüssigkeit nachweisen (Delbaere et al., 1996). Auch in der Follikularflüssigkeit selbst, wurde AII nachgewiesen (Jarry et al., 1988; Heimler et al., 1995). AT1 wurde ebenso im weiblichen Genitaltrakt, im Eileiter und Uterusepithel nachgewiesen (Vinson et al., 1995 a, b, 1996, 1997; Delbaere et al., 1996; Saridogan et al., 1996 a, b).

Die mRNA für **Renin und Angiotensinogen** wurde in Ratten- und Maushoden identifiziert (Deschepper et al., 1986; Dzau et al., 1987 a, b; Hellmann et al., 1988). Renin selbst wurde in den Leydigzellen von Ratten- und humanem Hoden beschrieben (Pandey et al., 1984., Naruse et al., 1985, Deschepper et al., 1986; Dzau et al., 1987 b). Diesbezüglich wird vermutet, dass beim Menschen Prorenin in das Seminalplasma sezerniert wird (Mukhopadhyay et al., 1995b).

ACE lässt sich im weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt nachweisen und wird während der Kapazitation humaner Spermatozoen von der Zelloberfläche freigesetzt (Foresta et al., 1987, Köhn et al., 1995, 1997, 1998).

Die Bildung von **AII** wurde in humanem Hoden beschrieben (Okuyaa et al., 1988, Leung & Sernia, 2003). Als Produktionsorte wurden die Leydigzellen und der Nebenhoden angegeben. Kürzlich wurde auch die Prostata als Produktionsort identifiziert (O'Mahony et al., 2005)

Weiterhin wurde beschrieben, dass AII im Ovar von Ratte und Mensch produziert wird (*Husain et al., 1987; Palumbo et al., 1989; Vinson et al., 1997*). Zudem kann die akrosomale Reaktion durch AII induziert werden, dieser Prozess scheint von Calcium und von Proteinkinasen abhängig zu sein, nicht jedoch G-Protein-vermittelt (*Köhn et al., 1998*). Im Rattenhoden wird die AII-Rezeptor-Expression über die hypothalamisch-hypophysäre Gonadenachse gesteuert und es gibt Hinweise darauf, dass AII am Hodenwachstum und/oder an dessen Differenzierung beteiligt ist (*Hirai et al., 1998*). Über AII-Rezeptoren Typ 1 (AT1) soll AII die Steroidproduktion in den Leydigzellen durch Umwandlung von Cholesterol in Pregnenolon induzieren. Weiterhin soll die Freisetzung von Gonadotropinen durch AII induziert werden (*Steele et al., 1981*). AII stimuliert die Motilität und Funktion humaner Spermatozoen (*Vinson et al., 1996, Müller et al., 1998, Müller et al., in Vorbereitung, Kapitel 4. 4.*). Die zugehörigen Rezeptoren wurden bislang jedoch nur zum Teil beschrieben (*Vinson et al., 1995, Müller et al., in Vorbereitung, Kapitel 4. 1. und 4. 2.*).

Die **AII-Rezeptoren (AT)** lassen sich im humanen Reproduktionstrakt nachweisen. Der Anstieg der Motilität humaner Spermatozoen lässt sich durch AT1-Rezeptorantagonisten verhindern (*Vinson et al., 1995, Kapitel 4.4., Tabelle 13, Abb. 42*). Während sich der Anstieg der Motilität gut mit dem Nachweis von AT1 auf humanen Spermatozoen und der Möglichkeit der Blockade dieses Effektes durch AT1-Rezeptorantagonisten erklären lässt (*Vinson et al., 1995b, 1996*), wurde für die Induktion der akrosomalen Reaktion durch AII bislang noch kein Rezeptor entdeckt (*Köhn et al., 1998*).

Es gibt Hinweise darauf, dass im männlichen Reproduktionstrakt auch AIV synthetisiert wird. So lassen sich unter anderem in der Prostata AIV-Rezeptoren nachweisen, deren Funktion jedoch bislang weitgehend unklar ist (*Dinh et al. 2001b*). Obwohl seit einiger Zeit bekannt ist, dass mehrere Teile des Hodens AT1 enthalten (*Kitami et al., 1992*), wurde die Hauptlokalisierung bislang den Leydigzellen zugesprochen (*Dufau, 1988*).

| RAS Komponente | Ort | Referenz |
|------------------------------------|--|--|
| Angiotensinogen | Testis (Leydig-Zellen); Epididymis; Prostata | Dzau <i>et al.</i> 1987*, Wong & Uchendu 1991, Leung* <i>et al.</i> 1999, Pinterova <i>et al.</i> 2000* |
| Renin | Leydig-Zellen; Epididymis; Prostata | Pandey <i>et al.</i> 1984 ^o *, Deschepper <i>et al.</i> 1986* Wong & Uchendu 1991, Pinterova <i>et al.</i> 2000* |
| ACE | Leydig-Zellen; Tubuli seminiferi ; Epididymis; Prostata; Spermatozoen; Seminalplasma | El-Dorry <i>et al.</i> 1983, Pandey <i>et al.</i> 1984b, Berg <i>et al.</i> 1986, Wong & Uchendu 1991, Mukhopadyay <i>et al.</i> 1995, Williams <i>et al.</i> 1995*, Kohn <i>et al.</i> Nassis <i>et al.</i> 2001 1998a, Pinterova <i>et al.</i> 2000*, |
| Angiotensin II | Testis; Epididymis; Prostata; Seminal- plasma | Okuyama <i>et al.</i> 1988 Zhao <i>et al.</i> 1996, O’O’Mahony <i>et al.</i> 2000, 2005 Dinh <i>et al.</i> 2001b |
| Angiotensins III IV oder (1–7) | Keine Angaben (Siehe Kapitel 5.5.3. und 5.5.4.) | |
| AT 1a, AT1b | Testis (Leydig-Zellen); Epididymis; Vas deferens; Prostate; spermatozoen | Magnan & Regoli 1979 Millan & Aguilera 1988, Grove & Speth 1989 Kitami <i>et al.</i> 1992*, Sum & Cheung 1995, Vinson <i>et al.</i> 1995, Leung <i>et al.</i> 1997b, 1998*, Dinh <i>et al.</i> 2001a, Müller <i>et al.</i> , in Vorbereitung |
| AT2 | Testis; Epididymis; Prostate Spermatozoen | Leung <i>et al.</i> 1997b, 1998a*, Speth <i>et al.</i> 1999 Dinh <i>et al.</i> 2001a Müller <i>et al.</i> , in Vorbereitung |
| Angiotensin- IV Bindungsstellen | Prostata (AT4) | Dinh <i>et al.</i> 2001b |

*Tabelle 21: Komponenten des RAS, die bislang im humanen männlichen Reproduktionstrakt ausfindig gemacht wurden. *= Genomnachweis, kein*= Proteinnachweis. Modifiziert nach: Leung & Sernia: RAS and male reproduction, 264, www.endocrinology.org, Journal of Molecular Endocrinology (2003) 30, 263–270*

Medikamente, die das RAS beeinflussen sind wichtiger Bestandteil internistischer Therapie der essentiellen Hypertonie und Herzinsuffizienz (Siehe S. 29ff). Die **Wirkung oraler ACE-Hemmer- oder AT1-Blocker-Einnahme auf die Spermatozoenproduktion und Funktion** ist jedoch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass lokales RAS im Hoden durch die Blut-Testes-Schranke komplett vom RAS des Blutkreislaufes isoliert ist (Vinson *et al.*, 1995). Inwieweit ACE-Hemmer die Blut-Testes-Barriere penetrieren können, ist nicht bekannt.

Einige Studien belegen jedoch, dass **testiculäres ACE nicht durch ACE-Hemmer inhibiert** werden kann (Jackson *et al.*, 1987, Johnston *et al.*, 1988, Sakaguchi *et al.*, 1988). Andere Studien hingegen weisen nach, dass die durch **AII induzierte Akrosomreaktion durch Captopril verhindert** werden kann (Foresta *et al.*, 1991).

Festgehalten werden muss in diesem Zusammenhang, dass AT1-Blocker die Wirkungen von AII auch auf humanen Spermatozoen inhibieren können und diesbezüglich keine Hinweise auf Auswirkungen einer oralen Medikation auf die Morphologie und Funktion humaner Spermatozoen existieren.

Diese Gruppe der Pharmaka inklusive AII bietet allerdings Möglichkeiten, die Methoden der assistierten Reproduktion zu optimieren und die Effizienz zu steigern, z.B. über **Zusatz von AII zu den Ejakulaten in der IUI und IVF**. Denn Geschwindigkeit und Anteil progressiv motiler Spermatozoen lässt sich mit der Rate erfolgreicher IUI und IVF korrelieren (Bollendorf *et al.*, 1996). Untersuchungen belegen weiter, dass die Motilität humaner Spermatozoen positiv mit der erfolgreichen Befruchtung einer Eizelle bei den Methoden der assistierten Reproduktion korreliert (Mahadevan und Trounson, 1984; Bongso *et al.*, 1989; Tucker *et al.*, 1991; Hinney *et al.*, 1993; Morales *et al.*, 1993). Auch die Geschwindigkeit der Spermatozoen korreliert positiv mit der Fertilisierungsrate (Holt *et al.*, 1985, Hinting *et al.*, 1988, Grunert *et al.*, 1989, Bongso *et al.*, 1989, Vantman *et al.*, 1989, Barlow *et al.*, 1991). Die Erklärung kann sein, dass eine höhere Motilität der Spermatozoen die Anzahl von Spermatozoen, die in vivo die Eizelle erreichen und somit mit dieser interagieren können, erhöht (Morales *et al.*, 1993.). AII erhöht die Motilität humaner Spermatozoen (Vinson *et al.*, 1996, Kapitel 4. 4.). AII-Zusatz in der IVF könnte somit dazu führen, dass weniger Versuche für eine erfolgreiche IVF notwendig wären oder die im frustranen Fall gewählte, teurere Methode ICSI in erfolgreichen Fällen nicht mehr notwendig wäre. Die Globalmotilität für die IVF sollte zudem über 20% liegen (Fisch *et al.*, 1990). Unter 30% Globalmotilität zeigt sich sogar eine signifikante Verschlechterung der Fertilisierungsraten in der IVF (Grunert *et al.*, 1989). Durch AII-Zugabe könnten diese prognostisch bedeutsamen Marken auch in den Fällen erreicht werden, in denen die Spontanmotilität geringer ist. Es wäre damit eventuell möglich, die „Spermatozoenausbeute“ bei der Ejakulataufbereitung zu erhöhen oder die

Befruchtungswahrscheinlichkeit bei der Spermatozoen-Eizellinteraktion zu steigern. Man könnte also auf einfache, kostengünstige Weise mehr Paaren helfen, die derzeit ungewollt kinderlos sind und ihnen enorme psychische und physische Belastungen, die mit der assistierten Reproduktion assoziiert sind, ersparen.

5. 1. 2. Relevanz von ACE für die Spermatozoenfunktion

ACE (synonym Kininase II) ist ein membrangebundenes Protein, das sich ubiquitär in Säugetiergewebe nachweisen lässt (*Costerousse et al., 1992; Sibony et al., 1993*). Es ist Teil des RAS und führt unter anderem durch Abspaltung zweier Aminosäuren zur Bildung von AII aus AI (*Siehe Kapitel 1.3. „Pharmakologie des Renin-Angiotensin- Systems*).

Das **humane ACE-Gen** befindet sich auf dem **Genlokus 17q32** (*Soubrier et al., 1988*). Es lassen sich zwei ACE-Isoformen in humanem Gewebe unterscheiden: Zum einen das somatische ACE, das in Endothelzellen, Zellen des proximalen Tubulus der Niere, Gehirn, Darmepithelzellen, Nebenhoden aber auch in Leydig-Zellen, Nebenhoden und Prostata (Tabelle 2, *Nassis et al. 2001*) nachweisbar ist (*Ehlers et al., 1986*). Weiterhin das testikuläre ACE, das sich in Nebenhoden und Hoden (*Cushmann & Chong 1971b; Hohlbrugger et al., 1982; Vanha-Perittule et al., 1985; Vinson et al., 1997*), in den Tubuli seminiferi, elongierenden Spermatozoen (*Strittmatter & Snyder, 1984*) und in den Entwicklungsstufen der Spermatozoen (*Brentjes et al., 1986, Langford et al., 1993, Mukhopadhyay et al., 1995b*) nachweisen lässt. ACE ließ sich bereits früh im Seminalplasma nachweisen, ohne jedoch konkrete Hinweise auf die Funktion vorweisen zu können (*Krassnigg et al., 1986*). ACE aus dem Seminalplasma entstammt vermutlich den Spermatozoen (*Köhn et al., 1995, Gatti et al., 1999*). Während das **somatische ACE** zwei homologe Domänen aufweist und **170 kDa** schwer ist, lässt sich im testikulären ACE nur eine dieser beiden Domänen nachweisen. **Testikuläres ACE** hat daher nur ein Molekulargewicht von **70 kDa** (*Soubrier et al., 1988*). Die **enzymatische Aktivität** ist dennoch **vergleichbar** (*Lanzillo et al., 1985*).

Die Regulation der testesspezifischen Isoform des ACE wird von einem spezifischen Promotor im zwölften Intron des ACE-Gens durchgeführt (*Zhou et al., 1995, 1996*). Testikuläres ACE ist, wie das somatische ACE, **membrangebunden** (*Ramchandran et al., 1994, Ehlers et al., 1996*). Während der Kapazitation wird ACE aus humanen Spermatozoen freigesetzt (*Foresta et al., 1987; Köhn et al., 1995*). Testes-ACE wurde membrangebunden im Bereich von Akrosom, postakrosomaler Region und Mittelstück nachgewiesen (*Köhn et al., 1998a*). Bemerkenswerter Weise besteht eine negative Korrelation zwischen der Motilität humaner Spermatozoen und der testiculären ACE-Aktivität (*Shibahara et al., 2001*).

Männliche **Knockout-Mäuse**, denen das ACE-Gen entfernt wurde, wiesen eine verminderte Fertilität auf (*Krege et al., 1995, Esther et al., 1996*). Morphologisch und im Paarungsverhalten der Tiere konnte allerdings kein Unterschied zur Referenzgruppe festgestellt werden. In der Studie von *Esther et al. (1996)* wurde das ACE-Gen durch zielgerichtete homologe Rekombination verändert. In der Studie von *Krege et al. (1995)* wurde das somatische und testikuläre ACE durch insertionelle Destruktion des Exon 14 im ACE Gen ausgeschaltet. Die homozygoten männlichen Mäuse, denen beide Isoenzyme fehlten, wiesen in der letztgenannten Arbeit **um ca. 34 mmHg erniedrigte Blutdruckwerte** auf, die Nierenarterien waren abnormal verdickt, der renale Cortex atrophiert. Bei den **weiblichen Tieren** ließen sich die gleichen Veränderungen der Nieren und Blutdruckwerte nachweisen, die **Fertilität** war **nicht beeinträchtigt**.

Die **männlichen Tiere** wiesen eine **reduzierte Fertilität auf**: im Vergleich wurden durch die Knock-Out-Mäuse lediglich 5% der Eizellen befruchtet, durch die Vergleichsgruppe aber 65% ($p < 0,001$). Die männlichen Knock-Out-Mäuse wiesen dabei normales Paarungsverhalten, normwertige Spermatozoendichte im Ejakulat, unauffällige Testeshistologie und lichtmikroskopisch unauffällige Spermatozoenmorphologie auf.

Auf der Suche nach der **Erklärung** für die diskrepanten Resultate fiel schließlich folgendes auf: Während die Spermatozoenmotilität bei diesen Tieren normal war, benötigten die Spermatozoen **deutlich mehr Zeit für die Ovidukt-Passage** (*Esther et al., 1996*). Eine Stunde nach der Paarung betrug die Spermatozoenzahl durchschnittlich 175 ± 86 , gegenüber 1135 ± 428 in der Referenzgruppe ($p < 0,001$). Die Spermatozoen wiesen weiterhin eine **verminderte Bindung an der Zona Pellucida** auf (*Hagaman et al., 1998b*). Durch das Ausschalten des somatischen ACE in Mäusen bei Belassen des Testes-ACE, was zu keiner Einschränkung der Fertilität führte, zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass somatisches ACE nicht relevant für die Fortpflanzung von Mäusen ist (*Hagaman et al., 1998b*). Die Ergebnisse führten zu der Aussage, Angiotensin I sei nicht das Substrat für das ACE auf Spermatozoen (*Kim et al., 1995, Hagaman et al., 1997*). ACE Knockout Mäuse wiesen wie oben beschrieben eine reduzierte Fertilität im männlichen Geschlecht auf (*Krege et al. 1995*). Der Effekt konnte rückgängig gemacht werden: Wurde das ausgeschaltete ACE-Gen reaktiviert, so stellte sich die Fertilität in den betroffenen Versuchstieren wieder her (*Ramaraj et al., 1998, Kessler et al., 2000*). Wurde allerdings das testesspezifische ACE durch das somatische ACE ausgetauscht, waren die Tiere weiterhin in Ihrer Fertilität reduziert, weswegen die ACE-Abhängigkeit der Fertilität lediglich auf das testesspezifische ACE bezogen wurde (*Ramaraj et al., 1998, Kessler et al., 2000*). In diesen Studien wurde weiterhin gezeigt, dass ein Ausschalten des testesspezifischen ACE zu reduzierter Oviduct-Passage und

zu eingeschränkter ZP-Penetration führt. Diese Ergebnisse sind konkordant zu den beschriebenen Resultaten von Hagaman et al. (*Hagaman et al., 1997*).

In einer anderen Studie wurde das Angiotensinogen-Gen in Mäusen ausgeschaltet (*Kim et al., 1995*). Diese **Angiotensinogen-Knock-Out-Mäuse waren in ihrer Fertilität nicht eingeschränkt**.

Die Resultate, dass somatisches ACE das testesspezifische ACE nicht ersetzen kann und in diesem Fall somit reduzierte Fertilität resultiert, das Ausschalten des Angiotensinogen-Gens jedoch nicht zu reduzierter Fertilität führte, implizierte die Auffassung, dass zwar testesspezifisches ACE und eventuell vorhandene Substrate, nicht aber Angiotensine und deren Rezeptoren für die Fertilität Bedeutung hätten und AI weiterhin nicht das Substrat für ACE sei (*Kim et al., 1995, Hagaman et al., 1997, Kessler et al., 2000*).

Es gibt jedoch **neuere Untersuchungen**, die zu gegenteiligen Ergebnissen gelangten. So wiesen *Tempfer et al. (2000)* im Gegensatz zu den Studien von *Kim et al. (1995)* eine **reduzierte Fertilität von Angiotensinogen-Knock-Out-Mäusen** nach.

In weiteren Studien wurde die Wirkung von ACE-Hemmern in vitro auf die Funktion humaner Spermatozoen untersucht (*Ratnasooriya et al., 1990, Foresta et al., 1991*). Es ließ sich zeigen, dass **Enalapril** in einer Konzentration von 20mM die progressive Motilität humaner Spermatozoen hemmen kann und die **Motilität** auf sehr niedrige Werte **reduziert** (*Ratnasooriya et al., 1990*). In dieser Arbeit wird allerdings angenommen, dass dieser Effekt nicht durch eine Inhibition von ACE erfolgt, sondern, dass es sich um einen direkten Effekt des Enalaprils auf die Motilität handelt.

Captopril konnte in der anderen Studie die **akrosomale Reaktion verhindern** (*Foresta et al., 1991*). Konkordant dazu konnte später gezeigt werden, dass AII die Akrosomreaktion induzieren kann (*Müller et al., 1997; Gur et al., 1998*). Diese Induktion der **Akrosomreaktion** ließ sich in der erstgenannten Studie **durch AT2-Antagonisten hemmen**. Somit ergaben sich erste Hinweise auf das Vorhandensein von AT2 auf humanen Spermatozoen, ein Nachweis gelang jedoch nicht (*Näheres hierzu in Kapitel 5. 3.*).

Schließlich muss bedacht werden, dass die Kapazitation durch viele Stoffe und auch durch physikalische Faktoren induziert werden kann (Siehe Kapitel 1.3.1). Das lokale RAS könnte diesbezüglich ein redundantes System sein, das neben anderen Systemen einspringt, wenn die Hauptinduktoren der Kapazitation ausfallen. Es könnte weiterhin auch ein zusätzliches System sein, das modulierend an der Kapazitation beteiligt, für diese jedoch nicht essentiell ist. Entsprechend wird der Blutdruck auch nicht alleine durch das RAS reguliert.

Zum Vergleich führt ein ACE-Knockout bei *Drosophila melanogaster* zum Absterben von 90% der Nachkommen, wobei die überlebenden männlichen Insekten zudem alle steril sind (Tatei et al., 1995).

Schließlich muss berücksichtigt werden, dass Kinder von Frauen, welche eine ACE-Hemmer-Therapie über die Embryonalperiode hinaus eingenommen hatten, ein signifikant erhöhtes Risiko für renale Fehlbildungen aufwiesen. Diese waren so schwerwiegend, dass ein Oligohydramnion mit assoziierten Komplikationen die Folge war. Weiterhin traten intrauterine Wachstumsretardierungen und persistierende Ductus arteriosi auf (CDC 1997, Tabacova et al., 2003). Theoretisch müsste also ein ACE-Knock-Out bei Mäusen entsprechende oder, da ja überhaupt kein ACE mehr verfügbar ist, schwerwiegendere Störungen erzeugen. Tatsächlich waren die Nieren histologisch bei diesen Tieren auffällig (Nierengefäße verdickt, Cortex atrophiert), weitere Störungen wurden jedoch nicht beobachtet (Krege et al., 1995, Esther et al., 1996). Dies verdeutlicht die Problematik der Vergleichbarkeit von Maus und Mensch.

Letztlich ist die Bedeutung des ACE für die Fertilität nur ansatzweise geklärt und bietet weiterhin ein interessantes und nach der derzeitigen Datenlage relevantes Gebiet für weitere Forschung, da der pharmakologische Einfluss auf das RAS wesentlicher Bestandteil kardiologischer Therapie ist und die Auswirkungen einer solchen Therapie auf den männlichen Reproduktionstrakt noch weitgehend unbekannt sind. Weiterhin könnten sich relevante Optimierungsmöglichkeiten durch diese Pharmaka für die IVF ergeben.

5. 2. Diskussion der Ergebnisse

5. 2. 1. AII in humanem Seminalplasma

Überblick

Die Frage nach der AII-Konzentration ist relevant, da sie einen Einfluss auf den durch AII induzierten Effekt haben könnte (Siehe Abb. 29). Eine erhöhte Konzentration könnte den Versuch der Kompensation bei „scheinbar“ mangelnder AII-Wirkung bedeuten (Rückkopplungsmechanismus). Bisherige Studien (O'Mahony et al., 2000, Zheng et al., 2001) wiesen zwar AII mittels RIA nach, die Studien hatten jedoch methodische und statistische Mängel.

Diese Arbeit weist erstmalig AII mittels kompetitiven ELISA nach und versucht die in den erwähnten Studien gemachten Fehler zu vermeiden. Die Ergebnisse differieren deutlich. Weiterhin wurde angenommen, dass die Produktionsstätte des AII im Seminalplasma die Leydigzellen und der Nebenhoden sei (Okuyaa et al., 1988). Neuere Untersuchungen weisen auch eine Produktion durch die Prostata nach (O'Mahony et al., 2005).

Diese Arbeit liefert ebenfalls Hinweise auf die Produktion des im Seminalplasma vorhandenen AII außerhalb von Hoden und Nebenhoden.

5. 2. 1. 1. Eigene Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen, wie in Kapitel 4. 3. ausgeführt, AII in einer Konzentration von etwa 1ng/ml im Seminalplasma nach (Tabelle 5 und 6, Abb. 23 und 24). Die hier beschriebenen Versuche wurden an drei verschiedenen Gruppen durchgeführt. Neben der Referenzgruppe gesunder Probanden, wurde die AII-Konzentration im Seminalplasma von Patienten der andrologischen Ambulanz und von vasektomierten, vorher fertilen Männern untersucht. Letztgenannte Gruppe sollte einen Hinweis auf den Ursprungsort von AII liefern: *Wenn AII im Seminalplasma in gleicher Konzentration wie in der Referenzgruppe vorhanden ist, kommt der Hoden als Ursprungsort, zumindest für den Großteil, des gemessenen AII, nicht in Frage. Wenn kein AII gemessen werden kann, die Referenzgruppe aber AII im Seminalplasma aufweist, wäre der Hoden die wahrscheinlichste Quelle für AII im Seminalplasma.*

Die Messungen im Seminalplasma vasektomierter Männer ergaben eine Konzentration von ca. **1ng/ml** und beweisen somit die Herkunft des AII aus einem Bereich distal vom Ductus deferens. Es machte für diese drei Stichproben wenig Sinn, deren Lage zu vergleichen, weil offensichtlich die drei Kollektive sich im Wesentlichen durch die Variabilität und nicht durch

die Lage unterschieden. Als Voraussetzung für den Test auf Gleichheit der Variabilität wurde dennoch zunächst mit dem Median-Test untersucht werden, ob sich Unterschiede bezüglich des Medians der Verteilung aufzeigen lassen. In diesem Fall konnte die Nullhypothese beibehalten werden ($p = 0.65$), d.h. es kann von einer guten **Übereinstimmung der Mediane der drei Kollektive** ausgegangen werden. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe eines **nichtparametrischen Tests nach Siegel-Tukey** die Gleichheit der Variabilität untersucht. Für den paarweisen Vergleich zwischen den Gruppen 1 und 2 ergab sich eine Wahrscheinlichkeit für das beobachtete oder ein extremeres Ereignis von $p=0.016$, zwischen den Gruppen 1 und 3 $p=0.021$ und zwischen den Gruppen 2 und 3 $p=0.959$. Es finden sich also deutliche Hinweise, dass zwischen den Gruppen 1 und 2 bzw. 1 und 3 **Unterschiede bezüglich der Dispersion der Verteilungen** bestehen (Sinngemäße Aussagen von *Herrn Dr. Boedecker und Frau Scheibelhut, Arbeitsgruppe „Medizinische Statistik“ am Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen*).

5. 2. 1. 2. Literatur

Eine AII-Produktion wurde schon vor längerer Zeit im humanen Hoden nachgewiesen (*Okuyama et al., 1988a*). AII konnte bereits in früheren Untersuchungen im Seminalplasma nachgewiesen werden (*O'Mahony et al., 2000; Zheng et al., 2003*).

In diesen Studien wurden fertile gegen subfertile Individuen getestet und die AII-Konzentration im Blut und im Ejakulat ermittelt ($n=34$). Die **Blutkonzentration** betrug in den Versuchen von *O'Mahony et al. (2000)* $16.0 \pm 3.1 \text{ pg/ml}$ (Mittelwert \pm SEM). Die **Seminalplasmakonzentration** war mit $51.6 \pm 9.3 \text{ pg/ml}$ ($p < 0.0001$), drei bis fünf Mal höher als im Blutplasma. In dieser Studie wurde ein **AII-RIA** verwendet (*Peninsula Laboratories, Merseyside, USA*). Der Nachteil des verwendeten RIA's ist bedingt durch eine **Kreuzreaktivität zu AI und AIII** (*O'Mahony et al. 2000*). Die Autoren stellten in diesen Untersuchungen fest, dass diese beiden Peptide im Seminalplasma nicht in nennenswerter Menge vorhanden waren. Der Anteil von AII an der Immunreaktion wurde mittels HPLC auf etwa 80% geschätzt. Dies ergäbe somit einen Effektivwert von etwa 41pg/ml, der so aber nicht von *O'Mahony et al. (2000)* publiziert wurde. Eine Korrelation zwischen der Blutplasmakonzentration und der Seminalplasmakonzentration konnte nicht gezeigt werden ($r=0,11$). Es bestand auch keine Korrelation zu Spermatozoenanzahl oder Fertilität. Auch *Zheng et al. (2003)* führten Konzentrationsmessungen durch und erhielten ähnliche Ergebnisse wie *O'Mahony et al. (2000)*. Sie fanden in Ihren Versuchen dabei eine signifikant

höhere AII-Konzentration im Seminalplasma azoospermer Individuen gegenüber Männern mit anderen Infertilitätsgründen ($p < 0,05$).

Der **Ursprungsort von AII** wurde von *O'Mahony et al., (2005)* kürzlich untersucht. In dieser Studie gelang der Nachweis, dass AII in der **Prostata von Ratten** und in **LNCaP-Zellen** (*humane androgenabhängige Prostatakarzinom-Zelllinie*) synthetisiert und sezerniert wird. Es wurde die mRNA für Renin, Angiotensinogen, ACE in Ratten- und in humaner Prostata nachgewiesen. Es wurde weiterhin die mRNA für AT1 und AT2 in humanem und AT1 im Ratten-Gewebe gefunden. In den sekretorischen Epithelzellen der Prostata wurde eine Kolo-kalisation von Renin und AT 1 beschrieben. Die Expression des AT1 war in prepubertären Rattenprostatagewebe größer als in postpubertären. Eine Captopril-Therapie führte zur erhöhten Expression des AT1 in der Rattenprostata.

Fraser et al. (2004, 2005) konnten einen **positiven Effekt von AII auf die Kapazitation** nachweisen, wenn AII mit Calcitonin oder FPP (Fertilization promoting peptide) kombiniert wurde. Hierbei war die Kombination von AII mit Calcitonin und/oder FPP wirksamer als die einzelnen Substanzen, wobei AII alleine keinen nennenswerten Einfluss auf die Kapazitation besaß. Aus diesen Ergebnissen schlossen *Fraser et al. (2004, 2005)* dass diese drei Substanzen den gleichen **Second messenger** aktivieren. Für Calcitonin und FPP konnte dabei eine cAMP-Produktion nachgewiesen werden, was für AII ebenfalls gelang (*Mededovic et al., 2004*). Dass cAMP im Prozess der Kapazitation eine wichtige Rolle spielt, ist seit längerer Zeit bekannt (*deLamirande et al., 1997*). Die **Induktion der cAMP-Produktion durch AII** wurde bei kapazitierten und nicht kapazitierten Spermatozoen beobachtet, wobei bemerkenswerte Wechselwirkungen zwischen AII, Calcitonin und FPP beschrieben wurden: Ein **Anstieg von cAMP löst die akrosomale Reaktion aus**. FPP, Calcitonin und Adenosin stimulieren in nicht kapazitierten Spermatozoen die cAMP-Produktion, in kapazitierten Spermatozoen hingegen hemmen diese Substanzen die cAMP-Produktion. AII stimuliert die cAMP-Produktion. Die Stimulation der cAMP-Produktion durch AII konnte **durch die Zugabe von FPP und Calcitonin verhindert** werden (*Frazer et al., 2005*). Die Erklärung kann sein, dass Calcitonin und FPP membran-assoziierte Adenylylcyclasen (**mAC's**) inaktivieren, die Ca^{2+} -abhängige Prozesse modulieren.

In der gleichen Studie konnte ergänzend gezeigt werden, dass **Pertussis-Toxin** die Effekte von Calcitonin und FPP blockiert (Pertussis-Toxin führt dazu, dass inhibitorische G-Proteine nicht mehr aktiviert werden können, da die Bindung von GTP blockiert wird, in der Folge produziert das stimulierende G-Protein zuviel cAMP).

Da AII wahrscheinlich über intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg seine Effekte vermittelt (*Wennemuth et al., 1999; Sabeur et al., 2000*), könnte eine Hemmung der mAC's die AII-induzierte

Wirkung verhindern ohne in die eigentliche Rezeptorbindung durch AII an den AT einzugreifen. *Frazer et al. (2005)* vermuten, dass die mAC's eine verfrühte Kapazitation verhindern bzw. begrenzen.

Die dargelegten Ergebnisse werden durch die Studien von *Son et al. (2000)* gestützt, wonach der spezifische T-Typ-Ca²⁺-Kanal-Antagonist Mibefradil die Induktion der Akrosomreaktion verhindern konnte.

5. 2. 1. 3. Vergleich und Diskussion der Ergebnisse

AII wurde bislang nicht mittels ELISA im humanen Seminalplasma bestimmt. Der **Vorteil** des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten **ELISA** gegenüber dem in den genannten Arbeiten von *O'Mahony et al., (2000)* und *Zheng et al., (2003)* verwendeten RIA, ist sein Fehlen radioaktiver Strahlung und demzufolge entsprechender Schutzmaßnahmen und Einrichtungen. Der Versuchsablauf ist wesentlich unkomplizierter. Aufgrund der hohen Spezifität für AII war zudem eine Überprüfung mittels HPLC nicht notwendig.

In diesen Arbeiten lag jedoch eine lange Zeitspanne zwischen der Gewinnung des Ejakulates und der Verarbeitung für den ELISA (siehe unten). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die tatsächliche AII-Konzentration höher liegt, als in diesen Arbeiten beschrieben, da AII sehr schnell durch die im Seminalplasma vorhandenen Enzyme degradiert wird. Weiterhin wurde in den zitierten Arbeiten ein parametrischer Test zur statistischen Auswertung benutzt, die **AII-Konzentration** im Seminalplasma ist jedoch **nicht standardnormalverteilt**. In den erwähnten Studien wurden keine vasektomierten Männer untersucht, somit ergaben sie auch keinen Hinweis auf den **Produktionsort von AII**.

Eine erneute Bestimmung der AII-Konzentration im Seminalplasma unter Berücksichtigung des Zeitfaktors war daher notwendig, um neben der möglichst kurzen Zeit bis zum Einfrieren der Proben, auf eine korrekte statistische Auswertung zu bestehen und mittels Untersuchungen vasektomierter Patienten, einen Hinweis auf den Produktionsort von AII zu gewinnen..

Die in dieser Arbeit gemessenen **AII-Konzentrationen** in den drei Gruppen liegen mit **1ng/ml** um das **zwanzig- bis fünfundzwanzigfache über den Ergebnissen von O'Mahony et al. (2000)**. Da die Zahl der Probanden mit n=34 etwa die gleiche Größenordnung aufwies wie in den dargelegten Versuchen (n=39), hatten diesbezügliche Faktoren keinen Einfluss auf die Ergebnisunterschiede. Populations- und umweltbedingte Faktoren sind prinzipiell denkbar, bedürften aber weit reichender Untersuchungen.

Für die **Gründe dieser enormen Diskrepanz** gibt es jedoch eine mögliche Erklärung:

Die unterschiedliche Verarbeitung der Proben!

Die Blutproben in der genannten Studie wurden sofort in eisgekühlten Vakuumküvetten gesammelt, die EDTA, Phenantrolin, Neomycin, Ethanol, Bestatin, Chymostatin und Hydroxyquinolin enthielten. Es handelt sich dabei u.a. um Gerinnungshemmer, Stabilisatoren und Enzyblocker. Es wurde weiterhin sehr genau darauf geachtet, die Kühlkette nicht zu unterbrechen (z.B. Zentrifugieren bei 4°C, Lagerung auf Eis). Die Seminalplasmaproben hingegen wurden erst nach einer **Verflüssigungszeit von 40 Minuten bei RT** und der Durchführung eines **Routinespermiogramms** entsprechend den Blutproben verarbeitet. In dieser Zeit, die nach eigener Erfahrung, bei zügiger **Verarbeitung, eine knappe Stunde** nicht unterschreiten kann (Zeitangaben werden hierzu in der Studie nicht gemacht), muss ein Teil der enthaltenen Peptide - auch **AII- abgebaut** worden sein, da das Seminalplasma sehr viele Enzyme aufweist, unter anderem Metalloproteasen und verschiedene spezifische und unspezifische Peptidasen und Proteasen, die unter anderem auch Angiotensine in kurzer Zeit abbauen (eigene, nicht aufgeführte und bislang nicht publizierte HPLC-Ergebnisse). Zumindest ist eine **Vergleichbarkeit** zwischen den Ergebnissen der Konzentrationsbestimmung im **Blutplasma** und den Messungen im **Seminalplasma nicht gegeben**, da die Proben sehr unterschiedlich verarbeitet wurden.

Der AII-Abbau könnte die Diskrepanz zu den aufgeführten Werten erklären, da in den eigenen Versuchen die Verflüssigungszeit möglichst kurz gehalten (etwa 10 Minuten bei 37°C) und die Verarbeitung der Proben weitestgehend gekühlt vorgenommen wurde.

Um eine weitere Verzögerung zu vermeiden, wurden zudem Probanden und andrologische Patienten ausgewählt, die aus vorhergehenden Versuchen bekannt waren. Die Routinespermiogramme früherer Untersuchungen lagen also vor, auf aktuelle Routinespermiogramme wurde daher verzichtet. Dies sparte etwa fünf bis zehn Minuten pro **Probe** ein, die etwa **15 Minuten nach Ejakulation eingefroren** wurden. Eine Korrelation zur Spermatozoenkonzentration wurde nicht durchgeführt, da dies zum multiplen Testen geführt hätte. Diesbezüglich könnte aber der Versuchsaufbau beibehalten werden. Es muss lediglich vor Aufbereitung der Ejakulatprobe eine kleine Menge abpipetiert werden, die im Anschluss an die Aufbereitung und Einfrierung der Probe ausgewertet werden könnte.

Nach den durchgeführten eigenen HPLC-Versuchen mit humanem Seminalplasma (Daten nicht aufgeführt und noch nicht veröffentlicht), könnte man die **Verarbeitung des Seminalplasmas weiter optimieren**, indem man bestimmte Peptidasen- und Proteinasehemmer direkt nach Erhalt der Probe, spätestens aber nach der Verflüssigungszeit, der Probe zuführt, um den weiteren AII-Abbau zu hemmen. Dies kann so dezidiert erfolgen,

dass die Generierung von AII ermöglicht wird, der Abbau aber gehemmt wird (Zugabe von Phosphoramidon: eigene, nicht publizierte HPLC-Untersuchungen).

Letztlich wird aufgrund der Verflüssigungszeit jedoch stets ein nicht zu beeinflussender Abbau im Seminalplasma stattfinden. Interessant wäre das Hinzugeben eines ACE-Hemmers zu einer bestimmten Anzahl Proben, um zu untersuchen, ob AII dann überhaupt noch entsteht und somit in wieweit die AII-Generierung von ACE im Ejakulat abhängig ist.

Bemerkenswert sind die Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit getesteten Gruppen (Tabellen 5-7, Abb. 24 und 25):

Probanden und vasktomierte Männer unterscheiden sich bezüglich ihrer Anatomie dadurch, dass bei letzteren der Ductus deferens beidseits durchtrennt ist. Folglich sollte in der Gruppe der vasktomierten Männer kein Bestandteil im Ejakulat auftauchen, der aus dem Hoden stammt. Die AII-Konzentrationen sind jedoch im Mittel vergleichbar. Dies impliziert, dass AII im Seminalplasma hauptsächlich aus anderen Quellen als dem Hoden stammen muss. *O'Mahony et al. (2000)* werfen in ihrer Arbeit im Schlussabsatz die Frage auf, wo das gefundene AII synthetisiert wird und vermuten eine enorm hohe intratestikuläre Produktion, um überhaupt nach Verdünnung durch die nachfolgenden Ejakulatbestandteile (aus Prostata, Bläschendrüse, Bulbourethraldrüsen etc.) die gemessene Konzentration zu erreichen. Von anderen Autoren wird der Hoden als wahrscheinlichster Ursprungsort für AII angesehen (*Leung et al., 2003*). Dennoch wurde kürzlich nachgewiesen, dass die Prostata bei Ratten der Ursprungsort von AII sein könnte (S. 104f, *O'Mahony et al., 2005*).

Die hier gezeigten **Ergebnisse** der ELISA-Untersuchung **schließen Hoden als Hauptproduktionsort** von dem im Seminalplasma gefundenen AII schließlich **aus**:

Der Ductus deferens ist bei vasktomierten Männern durchtrennt, im Ejakulat waren nachweislich keine Spermatozoen vorhanden. Dennoch weisen sie die gleiche AII-Konzentration wie gesunde Probanden auf. Somit kann AII nicht aus dem Hoden stammen. Weiter ergibt sich aus demselben Grund die Schlussfolgerung, dass die Aufgabe von ACE auf humanen Spermatozoen nicht die Umwandlung von AI in AII im Seminalplasma (möglicherweise aber in der Follikularflüssigkeit) ist, sonst dürfte AII bei Vasktomierten im Seminalplasma nicht erscheinen..

Die Blut-Hoden-Schranke ist für die meisten Peptide undurchlässig. Die fehlende Korrelation zwischen Blut- und Seminalplasma in der Studie von *O'Mahony et al., (2000)* ist ebenfalls ein Hinweis auf einen verschiedenen Ursprung des AII in diesen Kompartimenten. Allerdings ist der Wert im Seminalplasma aus den genannten Gründen vermutlich zu niedrig. Ein höherer Wert würde wahrscheinlich dennoch zu fehlender Korrelation führen.

In den erwähnten Arbeiten konnte **keine Korrelation zwischen Spermatozoenanzahl und AII-Konzentration** aufgezeigt werden. Eine der Hauptaussagen der Arbeit von *O'Mahony et al. (2000)* war, dass AII auch lokal gebildet werden muss, da sonst dieser Konzentrationsunterschied zwischen Blut und Seminalplasma nicht zu erklären ist. Dies geht bereits aus früheren Arbeiten hervor (Siehe Tabelle 20, Kapitel 5) und wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weiter gestützt.

Auch hier muss die Kritik bezüglich der unterschiedlichen Verarbeitung von Blut und Seminalplasma unter der Vorstellung des erfolgten AII-Abbaus bedacht werden. Dieses Ergebnis legt jedoch die Vermutung nahe, wie in Kapitel 5.1. bereits geäußert, dass AII im Seminalplasma andere Aufgaben als die Modulation der Spermatozoenbewegung haben könnte.

Zheng et al. (2003) fanden in Ihren Versuchen eine **signifikant höhere AII-Konzentration im Seminalplasma azoospermer Individuen** gegenüber Männern mit anderen Infertilitätsgründen ($p < 0,05$). In der hier dargelegten Arbeit konnte wie ausgeführt eine starke Schwankung der AII-Konzentration bei Patienten der andrologischen Ambulanz aufgezeigt werden, wobei die Proben der andrologischen Patienten jedoch nicht nach der Ursache der Fertilitätsstörung klassifiziert wurden.

5. 2. 1. 4. Bewertung

Es stellt sich die **Frage nach der Bedeutung von AII im Seminalplasma und warum es in so einer hohen Konzentration vorhanden ist:**

Trotz der dargelegten fehlenden Korrelation zwischen der AII-Konzentration im Seminalplasma und anderen Spermatozoenparameter beeinflusst AII verschiedene Spermatozoen-Parameter:

AII kann die **Kapazitation** induzieren (*Köhn et al., 1998*), die **Motilität** beeinflussen (*Foresta et al., 1991; Vinson et al., 1995b, 1996*, Kapitel 4. 4. und 5. 4.) und die **AR** auslösen (*Müller et al., 1997, Gur et al., 1998, Sabeur et al., 2000*). Dies sind wichtige Schritte im Befruchtungsprozess, die bis auf den erstgenannten Punkt nicht im Seminalplasma stattfinden dürfen, da die Spermatozoen weit entfernt von der Eizelle aktiviert werden würden und die Eizelle nie erreichen würden. Vielmehr würde es Sinn machen, diese Aktivierung kurz vor der Eizell-Interaktion durchzuführen. Das hierzu befähigte AII unter dieser Vorstellung vielmehr aus dem weiblichen Organismus, respektive der Follikularflüssigkeit, stammen. Tatsächlich weist die Follikularflüssigkeit AII auf (*Heimler et al., 1995, Vinson et al., 1997*). *Sabeur et al. (2000)* führten ihre Versuche an equinen Spermatozoen durch, die Wirkung von AII war

dabei konzentrationsabhängig. Hohe Konzentrationen (1 μ M) zeigten einen signifikant niedrigeren Effekt als niedrige Konzentrationen (1nM). Ähnliche Tendenzen ließen sich in den hier dargelegten Ergebnissen der Motilitätsmessungen finden (Abb. 29). In der Studie von *Sabeur et al.* (2000) fand sich eine **Hemmung der AR-Induktion durch AII durch Zugabe von Losartan[®]** (AT1-Antagonist). Schließlich ließ sich in kapazitierten Spermatozoen, der AT1 in der Kopf-Region equiner Spermatozoen nachweisen

Als **Kapazitation** wird der Reifungsprozess der Spermatozoen außerhalb des männlichen Genitaltrakts in geeigneter Umgebung bezeichnet, der Voraussetzung für die Befruchtungsfähigkeit männlicher humaner Spermatozoen ist (*Austin, 1952*). Hinzu kommt also die Tatsache, dass Spermatozoen zunächst den Prozess der Kapazitation durchlaufen und mehrere Stunden im weiblichen Genitaltrakt verbringen müssen, um befruchtungsfähig zu sein (*Yanamagashi, 1994*). AII kann tatsächlich die Kapazitation humaner Spermatozoen induzieren (Köhn et al., 1998). Die **Motilitätssteigerung** jedoch muss vor allem auf dem Weg und in der Nähe der Eizelle erfolgen. Dies würde zu den Ergebnissen passen, dass AII in der Follikularflüssigkeit in hohen Konzentrationen nachweisbar ist (*Delbaere et al., 1996, Heimler et al., 1995*), während AII im Ejakulat sehr schnell degradiert wird (eigene HPLC-Messungen, Daten nicht aufgeführt). Somit könnte AII in verschiedener Weise an der Funktion humaner Spermatozoen beteiligt sein. Zum einen könnte AII die Kapazitation mitbeeinflussen, hierzu stünde AII in nennenswerter Konzentration im Seminalplasma zur Verfügung, zum anderen könnte es am „Endspurt“ kurz vor der Eizelle beteiligt sein (Siehe Kapitel 5. 4.).

Wie bereits erläutert stimmt dies mit den Beobachtungen von O'Mahony et al. (2000) und Zheng et al. (2003) darin überein, dass in diesen Arbeiten keine Korrelation zwischen Spermatozozahl und AII-Konzentration gefunden werden konnte. Andererseits bestünde die Möglichkeit, dass nur solche Spermatozoen durch AII in dieser frühen Phase akrosomal reagieren, die fehlerhaft sind. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die **AR durch AII in Spermatozoen fertiler Männer kaum**, in denen von **andrologischen Patienten** hingegen **deutlich ausgelöst** wird (*Frazer et al., 2005*). Dann entspräche dies einem Schutzmechanismus. Diese Spekulationen müssten jedoch in weiteren Studien näher untersucht werden.

Wie in Kapitel 5.2. bereits dargelegt, gibt es sowohl Hinweise darauf, dass Angiotensinogen-Knock-Out-Mäuse keine Fertilitätsstörungen aufweisen (*Kim et al., 1995*), wie Hinweise darauf, dass dies doch der Fall ist (*Tempfer et al., 2000*) und die Überlebenszeit der Spermatozoen ex utero verkürzt ist (*Tsuchida et al., 1998, Doan et al., 2001*). In Anbetracht

dieser Überlegungen könnte weiter angenommen werden, dass selbst wenn Angiotensinogen-Knock-Out-Mäuse eine unauffällige Fertilität aufweisen würden (*Kim et al., 1995* vs. *Tempfer et al., 2000*), dies dadurch erklärt werden könnte, dass die Aufgabe des **AII im Seminalplasma** die **Induktion respektive Modulation des Kapazitationsvorganges** sein könnte. Ein Ausfall des AII diesbezüglich könnte durch die vielen anderen Faktoren, die die Kapazitation induzieren, kompensiert werden. Die übrigen Wirkungen sind erst nach Abschluss der Kapazitation und in der Nähe der Eizelle sinnvoll und könnten durch AII aus der Follikularflüssigkeit induziert werden.

Es wurde der Versuch unternommen die Bedeutung von AII im weiblichen Reproduktionstrakt für die Funktion von Spermatozoen damit zu widerlegen, dass *Nagata et al. (1996)* keine Auffälligkeiten bezüglich der Fertilität bei weiblichen Angiotensinogen-Knock-Out-Mäusen fanden. Es wurde jedoch nicht überprüft, ob in der Follikularflüssigkeit bei diesen Tieren tatsächlich kein AII nachgewiesen werden kann.

Zusammengefasst stammt AII im Seminalplasma am ehesten aus der Prostata. Es könnte die bereits vermutete modulierende Funktion für die Kapazitation und nicht die Relevanz eines „Entweder-oder-Systems aufweisen, genauso wie ACE-Knock-Out-Mäuse auch ohne AII noch einen Blutdruck haben.

Nach dieser Modulation/Induktion der Kapazitation bei Kontakt mit den Spermatozoen, würde es demzufolge schnell degradiert werden, sodass die AR nicht ausgelöst würde oder die Motilität vorschnell erhöht würde. Diese beiden Reaktionen könnten später durch AII aus der Follikularflüssigkeit moduliert/induziert werden.

Während die Konzentration unter den Probanden und vasktomierten Männern vergleichbar war und die Streuung in beiden Fällen gering (Tabelle 6, Abb. 27, 28), fiel die Gruppe der andrologischen Patienten signifikant aus diesem Rahmen heraus. Die Ursache ist unklar und bedarf weiterer Abklärung. Vorstellbar wäre eine Gegenregulation bei ausbleibendem Effekt aber auch eine Ursache für Infertilität in einem Teilkollektiv könnte denkbar sein, sodass auch hier weitere Untersuchungen notwendig sind.

Anhand der hier gezeigten Ergebnisse ist, trotz des signifikanten Unterschiedes zwischen der Patienten- und den beiden anderen Gruppen nicht die Aussage möglich, dass die AII-Konzentration (Erhöhung oder Erniedrigung) mit einer bestimmten Fertilitätsstörung korreliert, da die Patienten diesbezüglich nicht kategorisiert wurden.

5. 2. 2. AII-Rezeptoren auf humanen Spermatozoen

Überblick

AII vermittelt seine Effekte über membrangebundene Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche vieler Gewebe nachweisen lassen (siehe Kapitel 1. 4. 1. 3. und 1. 4. 1. 4.). Bislang wurde der AT1 auf humanen Spermatozoen immunocytochemisch und im Western Blot nachgewiesen (Vinson et al., 1995). Ein direkter AT2-Nachweis gelang nicht.

AT2-Antagonisten konnten die Induktion der akrosomalen Reaktion durch AII blockieren, es gab somit indirekte Hinweise auf die Lokalisation von AT2 auf humanen Spermatozoen (Köhn et al., 1998).

Zudem zeigte Sabeur et al. (2000), dass der AT1 bei Pferden im Bereich des Akrosoms vorhanden ist. Eine Abgrenzung gegenüber diesem Tiermodell ist ebenfalls notwendig, auch zur Bewertung der üblichen Verallgemeinerung von Ergebnissen.

Diese Arbeit liefert den Beweis für die Lokalisation von AT2 im Akrosomalbereich humaner Spermatozoen und das Fehlen von AT1 in dieser Lokalisation. Dies ist somit der erste Nachweis von AT2 auf humanen Spermatozoen und der erste Hinweis auf Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies. Weiterhin werden beide Rezeptoren mittels Western-Blot nachgewiesen.

5. 2. 2. 1. Eigene Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte erstmals der **AT2 am Spermatozoenkopf** nicht-kapazitierter Spermatozoen eindeutig nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4. 1. 2., Abb. 18-20). Mittels des polyklonalen Primärantikörpers AT2-C18 (*Firma Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland*) ließ sich eine deutliche Immunreaktion im Bereich der akrosomalen Kappe erzielen (Abb. 18). Zur Verdeutlichung der Lagebeziehung zum Nukleus, wurde die DNA in weiteren Versuchen mit DAPI (*Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland*) markiert (Abb. 19). Die **Intaktheit des Akrosoms** wurde mittels **PSA-FITC** (*Sigma- Aldrich, Schnelldorf, Deutschland*) kontrolliert und bestätigt (*Köhn et al., 1997, Abb. 20*). Es lässt sich somit die Lagebeziehung des Rezeptors zum Nukleus und zur akrosomalen Kappe feststellen. Die Markierung durch AT2-C18 ist absolut deckungsgleich mit der des Akrosoms durch PSA-FITC (Abb. 20), sodass, ungeachtet der Ergebnisse vorangegangener Untersuchung, die Vermutung einer engen, vermutlich auch funktionellen Beziehung zwischen diesen zwei Strukturen berechtigt ist.

Der **qualitative Nachweis des AT2 mittels Immunoblot** erfolgte mit demselben Primärantikörper, wies den AT2 mit einem **Molekulargewicht von 43 kDa** nach und

bestätigt somit mit einer weiteren Methode die Existenz des AT2 auf humanen Spermatozoen (Abb. 22). Die Kapazitation der Spermatozoen führte zu keiner nennenswerten Änderung der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

In dieser Arbeit wurde der **AT1 erstmals mittels kommerziellem Antikörper im Immunoblot nachgewiesen**. Es wurde der poliklonale Antikörper (AT1-306), der gegen die Aminosäuren 306 bis 396 des carboxyterminalen Endes des humanen AT1 gerichtet ist, erfolgreich eingesetzt. Das **Molekulargewicht** der nachgewiesenen **AT1** betrug **41 kDa**, **im Gegensatz zu den Ergebnissen von Vinson et al. (ca. 60kDa)**.

Der Nachweis des AT1 gelang mit dem Antikörper AT1-306 in der Immunzytochemie (Abb. 16) und im Western-Blot (Abb. 21). Die Bande ist dabei sehr schmal. Ursächlich ist am ehesten die Ausbeute an Flagellen in der DGZ, es ist durchaus denkbar, dass die Auftrennung nicht optimal funktioniert und so in der verwendeten Percoll-Phase die Menge an Flagellen und dementsprechend Rezeptoren gering ist. Der Antikörper gegen die Aminosäuren 15-24 des aminoterminalen Endes des humanen AT1 (AT1- N10) zeigte hingegen überhaupt keine Immunreaktion an humanen Spermatozoen oder Banden im Western-Blot (Daten nicht gezeigt).

Die Positivkontrollen in beiden Fällen (AT1 und AT2) sind nicht zufriedenstellend:

Zum Zeitpunkt der Versuche war eine AT1-Positivkontrolle nicht erhältlich, die zusätzlich mitgeführte Negativkontrolle bestätigt die Spezifität des Primärantikörpers daher nur zum Teil. Die Positivkontrolle für den AT2 ist nicht so scharf begrenzt, wie es eigentlich zu erwarten wäre. Ursache könnte eine Verunreinigung der Kontrolle oder eine Fragmentation, Agglutination etc. sein.

Diese Kritikpunkte ändern nichts an der eindeutigen Reaktion der Primärantikörper mit entsprechendem Nachweis der beiden Rezeptoruntertypen. Weiterhin muss man diesbezüglich die Immunzytochemie berücksichtigen, die als weiteres qualitatives Verfahren, die beiden Rezeptoruntertypen zweifelsfrei nachweist. Für den Immunoblot wurden die gleichen Primärantikörper verwendet.

Mittels **Immunzytochemie** erfolgte der Nachweis des AT1 im Bereich der **postakrosomalen Region**, des **Mittelstück** und des **Flagellums** humaner nicht kapazitierter Spermatozoen. Es wurde kein Wechsel der Rezeptorverteilung nach Kapazitation oder Akrosomreaktion in der Immunzytochemie beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis der beiden AII-Rezeptoruntertypen wurde weiterhin mittels Immunelektronenmikroskopie durchgeführt (*Müller et al., in Vorbereitung, Daten nicht gezeigt*). Hierbei zeigte sich der **AT1** in der akrosomalen Region, im Mittelstück und im Flagellum humaner Spermatozoen.

Im Gegenzug wurde der **AT2** nur im Bereich des Akrosoms gefunden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den hier aufgeführten Ergebnissen der Immunzytochemie und des Immunoblots.

Es wurden in sämtlichen Immunreaktionen Kontrollpeptide und Leerwerte (ohne I°-AK) konsequent als Negativkontrollen mitgeführt, um eine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper auszuschließen..

5. 2. 2. 2. Literatur

Der **AT1 ist im menschlichen Organismus** weit verbreitet, während der **AT2** lediglich im Herz, dem Nebennierenmark, Gefäßendothel, zentralen Nervensystem (ZNS) und im Reproduktionstrakt in nennenswerter Menge vorkommt (*Tabelle 2, S. 28*). Im Gegensatz dazu findet sich der AT2 in sehr hoher Zahl in fetalem Gewebe (*Chung & Unger, 1998a; Mukoyama et al., 1993*). Diese Diskrepanz führte zu der Vermutung, dass AT2 eine wesentliche Rolle bei **Wachstum und Differenzierung von Geweben** spielt. Unter physiologischen Bedingungen führt überdies die Interaktion von AII mit dem AT2 zu einer Hemmung der Angiogenese (*de Casparo M., 1999*).

AT2 werden weiterhin in großer Menge in **fetalem Rattengewebe** gefunden (*Grady et al., 1991; Tsutsumi et al., 1991*). Während der postnatalen Entwicklungsphase, zeigen glatte Muskelzellen aus der Aortenwand von Ratten (*Grady et al., 1991*) und noch undifferenziertes Gewebe der Nierenglomeruli (*Ciuffo et al., 1993a*) fast ausschließlich eine AT2- Expression. Diese Ergebnisse legten abermals die Vermutung nahe, AT2 spiele eine entscheidende Rolle in der Organentwicklung (*Grady et al., 1991; Ciuffo et al., 1993b*). Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse von Versuchen an **Knock-out-Mäusen, denen das Gen für AT2 fehlt**. Sie zeigen eine normale embryonale und fetale Entwicklung (*Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995b*).

Angiotensin II-Rezeptoren (AT) wurden mehrfach **im männlichen Reproduktionstrakt** nachgewiesen (Siehe Tabelle 21 S. 97). *Kenahara et al. (1998)* demonstrierten, dass der **AT2** der **am meisten exprimierte Rezeptor in Hodengewebe während der neonatalen**

Entwicklungsphase ist. Während der Pubertät wurde hingegen ein **Wechsel zu einer vermehrten AT1- Expression** beobachtet.

Der AT1 wurde speziell in Leydigzellen nachgewiesen (*Millan & Aguilera, 1988; Vinson et al., 1995 a, b*). AII führt hier über AT1 zu einer **Hemmung der Testosteronproduktion** (*Khanum & Dufau, 1988*). Diese Ergebnisse könnten auf die Umstellung der Hodenfunktion während der Pubertät hinweisen.

O'Mahony et al., (2005) gelang kürzlich der **Nachweis der mRNA für AT1 und AT2 in humanem Prostata-Gewebe** und AT1 im Ratten-Prostatagewebe. Es wurde weiterhin die mRNA für Renin, Angiotensinogen, ACE in Ratten- und in humaner Prostata nachgewiesen. In den sekretorischen Epithelzellen der Prostata wurde eine **Kolokalisation von Renin und AT 1** beschrieben. Die Expression des AT1 war in prepubertären Rattenprostatagewebe größer als in postpubertären. Eine **Captopril-Therapie** führte zur **erhöhten Expression des AT1 in der Rattenprostata**.

AT1 ließ sich weiterhin im **Keimepithel, in Keimzellen und in den Flagellae sich entwickelnder Spermatozoen** nachweisen (*Vinson et al., 1995b*). In einer weiteren Studie ließ sich ein intrazellulärer Calciumanstieg in motilen Mausspermatozoen durch AII induzieren, dieser Effekt konnte durch Losartan® gehemmt werden (*Wennemuth et al., 1999*). *Sabeur et al. (2000)* fanden in equinen Spermatozoen ebenfalls einen durch AII ausgelösten Ca²⁺-Influx.

Auf **humanen Spermatozoen** gelang der Nachweis von AT1 postakrosomal, am Mittelstück und am Flagellum (*Vinson et al., 1995*). Das Ausschalten des Angiotensinogen-Gens sowie das **Ausschalten des AT1-Gens** inklusive aller Rezeptoruntertypen (AT1a und AT1b) führte in Tierversuchen zu einer **reduzierten Spermatozoenüberlebenszeit** ex utero (*Tsuchida et al., 1998, Doan et al., 2001*). AT1- Knock-out-Mäuse zeigten in einer anderen Studie jedoch **keine Einschränkung der Fertilität** (*Ito et al., 1995*).

Neben der Beteiligung von AT2 (*Köhn et al., 1998b*) gibt es auch Hinweise auf die Beteiligung von AT1 an der **Induktion der Akrosomreaktion** (*Gur et al., 1998*). Die Akrosomreaktion wird über spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle gestartet, physiologische Aktivatoren dieser Kanäle sind Progesteron (*Foresta et al., 1993*) und der Kontakt mit der Zona pellucida (*Florman et al., 1992; Arnoult et al., 1996*), aber auch intrazelluläre Prozesse, die durch AII-Rezeptoren angestoßen werden (*Müller et al., 1997, Wennemuth et al., 1999*).

Ein **AII induzierter Ca²⁺-Influx** in humanen Spermatozoen, kann **durch den spezifischen AT1-Antagonist Losartan®** gehemmt werden kann (*Wennemuth et al., 1999*). In weiteren

Studien konnte die Induktion der Akrosomreaktion eindeutig durch Ca^{2+} -Antagonisten wie das Mibefradil (selektiver T-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonist) verhindert werden (Son et al., 2000).

Die **Blockierbarkeit der AII-induzierten Motilitätszunahme durch Losartan[®]** wurde von Vinson et al. (1995) beschrieben, statistisch jedoch allem Anschein nach **falsch ausgewertet**: Motilitätsparameter sind nicht standardnormalverteilt, die Ergebnisse von Vinson et al., (1995 und 1996), wurden jedoch mit einem parametrischen Test ausgewertet. Die Werte sind also korrekt, anhand dieser statistischen Methode kann man jedoch keine Signifikanz der Unterschiede postulieren. Zudem scheint der Versuchsaufbau explorativ und nicht konfirmatorisch gewesen zu sein (Keine 0-Hypothese etc.). Damit wäre die Anzahl an Variablen bei konfirmatorischer Datenanalyse mit multiplen Testen gleichzusetzen und somit unzulässig.

Auch der **weibliche Genitaltrakt** weist ein lokales RAS auf (Hsueh, 1988; Sealey & Rubattu, 1989; Hagemann et al., 1994; Vinson et al., 1997). **AT1** wurde im weiblichen Genitaltrakt, im **Eileiter und Uterusepithel**, nachgewiesen (Vinson et al., 1995 a, b, 1996; Delbaere et al., 1996; Saridogan et al., 1996 a, b).

In einer Studie von Sabeur et al. (2000) wurde der AT1 im Mittelstück und im Flagellum **equiner Spermatozoen** mittels AT1-N10 nachgewiesen. Nach Kapazitation ließ sich der Rezeptor auch im vorderen Teil des Spermatozookopfes, der Equatorialregion und im postakrosomalen Bereich sowie im Flagellum nachweisen. In nicht kapazitierten **bovinen Spermatozoen** konnte der **AT1** lediglich im **Flagellum** detektiert werden, wohingegen nach Kapazitation sich zusätzlich der **postakrosomale Bereich** anfärbte (Gur et al., 1998).

Die akrosomale Reaktion von equinen Spermatozoen durch Induktion mit AII konnte durch Losartan[®] effektiv gehemmt werden, was unterstreicht, dass sich der AT1 im akrosomalen Bereich und in der Equatorialregion kapazitierter equiner Spermatozoen befindet. Zusätzlich fand sich ein **vorübergehender Calciuminflux** in equinen Spermatozoen **unter Zugabe von AII, welcher durch Losartan[®] verhindert werden konnte** (Sabeur et al., 2000). Weitere Studien zeigten eine Abhängigkeit der akrosomalen Reaktion nach Zugabe von AII, von der extrazellulären **Calciumkonzentration**. In bovinen Spermatozoen konnte die AII-induzierte Akrosomreaktion durch Vorinkubation mit Losartan[®] oder durch Benutzung calciumfreien Mediums unterbunden werden (Gur et al., 1998).

Diese Studien indizieren, dass AII seinen Einfluss auf die akrosomale Reaktion über einen Calciuminflux, wahrscheinlich **G-Protein** vermittelt, bewirkt.

Die Frage nach dem **Second-messenger** wurde durch Arbeiten von *Fraser et al.*, (2004, 2005) und *Mededovic et al.*, (2004) näher untersucht (Vergl. S. 105f.). **cAMP** ist am Prozess der Kapazitation beteiligt (*deLamirande et al.*, 1997). Die Induktion der cAMP-Produktion durch AII wurde bei kapazitierten und nicht kapazitierten Spermatozoen beobachtet (*Mededovic et al.*, 2004).

Fraser et al. (2004, 2005) konnten einen **positiven Effekt von AII auf die Kapazitation** nachweisen. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass Pertussis-Toxin die Effekte von Calcitonin und FPP blockiert (*Pertussis-Toxin führt dazu, dass inhibitorische G-Proteine nicht mehr aktiviert werden können, da die Bindung von GTP blockiert wird, in der Folge produziert das stimulierende G-Protein zuviel cAMP*). Da AII wahrscheinlich über intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg seine Effekte vermittelt (*Wennemuth et al.*, 1999; *Sabeur et al.*, 2000), könnte eine Hemmung der mAC's die AII-induzierte Wirkung verhindern ohne in die eigentliche Rezeptorbindung durch AII an den AT einzugreifen. *Fraser et al.* (2005) vermuten, dass die mAC's eine verfrühte Kapazitation verhindern bzw. begrenzen

Die dargelegten Ergebnisse werden durch die Studien von *Son et al.* (2000) gestützt, wonach der spezifische T-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonist Mibefradil die Induktion der Akrosomreaktion verhindern konnte (Vergl. S. 106f).

5. 2. 1. 3. Vergleich und Diskussion der Ergebnisse

In der **vorliegenden Arbeit** konnte **erstmal**s der **AT2 auf humanen Spermatozoen**, in der akrosomalen Region, nachgewiesen werden (*Abb. 18-20 und 22, S. 62f*). Der Nachweis gelang mittels Immunzytochemie und mittels Immunoblot. Weiterhin wurde der **AT1 auf humanen Spermatozoen** nachgewiesen (*Abb. 16+17 und Abb. 21*). Zuletzt genannte Ergebnisse **entsprechen den Resultaten von *Vinson et al.* (1995a)** mit einem Nachweis postakrosomal, im Mittelstück und im weiteren Verlauf des Flagellums. *Vinson et al.*, (1995) verwendeten einen monoklonalen Antikörper (6313/G2) gegen eine spezifische Aminosäuresequenz des AT 1 (Aminosäuren 8-17) (*Barker et al.*, 1993). Unter Zuhilfenahme dieses Antikörpers, konnte der AT1 in verschiedenen Bereichen des männlichen Reproduktionstraktes, inklusive vaskulärem und sekretorischem Epithel, nachgewiesen werden (*Vinson et al.*, 1995a). Die Rezeptoren wurden im Flagellum von reifenden Rattenspermatozoen und humanen Spermatozoen gefunden.

Diese Rezeptoren wiesen eine Funktion auf, da eine Zugabe von AII die Motilität und die lineare Geschwindigkeit der Spermatozoen erhöhte. Zudem vermochte Losartan[®], ein selektiver AT1-Antagonist, den AII vermittelten Effekt zu unterbinden (*Vinson et al.*, 1996).

Hingegen zeigte sich **kein Effekt von AII auf die Motilität equiner, nicht-kapazitierter Spermatozoen** (*Sabeur et al., 2000*).

Während equine Spermatozoen den AT1 im vorderen Teil des Spermatozoenkopfes, der Equatorialregion und im postakrosomalen Bereich, sowie im Flagellum aufweisen (*Sabeur et al. 2000*) und in nicht kapazitierten bovine Spermatozoen der AT1 lediglich im Flagellum und nach Kapazitation zusätzlich postakrosomal nachweisbar war (*Gur et al., 1998*), weisen **humane Spermatozoen den AT2 ausschließlich am Spermatozoenkopf** im Bereich des Akrosoms und **AT1 lediglich postakrosomal, am Mittelstück und im weiteren Verlauf des Flagellums** auf (Abb. 16-20). Die Induktion der Kapazitation änderte nichts an dieser Verteilung (Daten nicht gezeigt).

Die berechnete Frage war, **welche AT** die AII-induzierte **Akrosomreaktion** vermitteln? Während die Arbeit von *Köhn et al. (1998)* Hinweise auf die Beteiligung der AT2 lieferte, hielten *Gur et al. (1998)* die AT1 für die entscheidenden Rezeptoren.

Die vorliegende Arbeit liefert den definitiven Beweis für die Lokalisation des **AT2** im Akrosomalbereich. Zum einen wird die Lokalisation der AT1 und der AT2 eindeutig durch die Immunzytochemie belegt (Kapitel 4.1, Abb. 16-20), zum anderen weisen die durchgeführten Blockierungsversuche nach, dass AT2-Antagonisten keinen Effekt auf die Motilität besitzen, während AT1-Antagonisten diese jedoch durchaus beeinflussen können (Kapitel 4.4.3.).

Prinzipiell haben jedoch beide Arbeitsgruppen Recht, da die Verteilung der AT artspezifisch ist: *Gur et al. (1998)* führten ihre Untersuchungen an bovinen Spermatozoen durch, *Köhn et al. (1998)* an humanen Spermatozoen.

Die **verwendeten Antikörper** waren polyklonale Antikörper gegen Aminosäuresequenzen des AT2. Hier zeigte sich eine Markierung nur unter Einsatz des AT2-C18, der sich gegen eine Aminosäuresequenz im carboxyterminalen Bereich des **AT2** richtet. Weiterhin ließ sich mit diesem Antikörper eine Bande im Westernblot bei **43kDa** identifizieren, die dem AT2 entspricht. Der AT2 ist wie der AT1 ebenfalls ein Sieben-Transmembran-Rezeptor, bindet jedoch nicht an ein G-Protein sondern hat **Phosphotyrosinase-hemmende Wirkung** (*Vinson et al., 1997*). Diese Resultate korrelieren mit früheren Ergebnissen, dass der Effekt von AII auf die Akrosomreaktion calciumabhängig aber G-proteinunabhängig (sondern proteinkinasegekoppelt) ist (*Köhn et al., 1999*). Da der spezifische AT2-Rezeptorantagonist PD 123319 in früheren Versuchen die AII-induzierte Akrosomreaktion verhindern konnte (*Köhn et al., 1998b*), lag es nahe, dass der AT2 auf der Oberfläche des Spermatozoenkopfes lokalisiert sein musste, sodass die **bisherigen Probleme des Nachweises am ehesten methodisch begründet** waren. Die Probleme des Nachweises beruhen vermutlich auf der

Fixierung der Spermatozoen auf dem Objektträger und dem verwendeten Medium: Zunächst wurden mehrere anerkannte Methoden versucht, die alle zu keinen brauchbaren Ergebnissen führten (Bloßes Trocknen an der Luft, Fixierung mit Formaldehyd in verschiedenen Konzentrationen, bei verschiedenen Temperaturen u. a., als Medium wahlweise HTF und PBS für jede Alternative). Schließlich wurde statt HTF nur noch PBS verwendet, da dieses Medium in den Versuchen kaum bis gar kein Hintergrundrauschen (unspezifische Markierung des Sekundärantikörpers) auslöste und die **Fixierung mit absolutem Methanol für 30 Sekunden, nach Trocknen an der Luft** durchgeführt, die zu den dargestellten Ergebnissen führte.

Der qualitative Nachweis von AT1 und AT2 wurde durch den **Immunoblot** ergänzt, mit dem Nachweis einer einzelnen Bande im Bereich von ca. **41 kDa (AT1) und 43 kDa (AT2)** in humanen Spermatozoen. Der **AT1** wird wahrscheinlich erheblich posttranslational modifiziert. Darauf weisen die extrazellulären Sequenzen hin, die multiple N-Glycosilierungen aufweisen. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass sein **Molekulargewicht in der Gelelektrophorese abhängig von der Glykosilierung** ist (*Griendling et al., 1996; Gur et al., 1998*). *Gur et al. (1998)* identifizierten eine einzelne Proteinbande im Bereich von **41 kDa** in **bovinen** Spermatozoen unter Einsatz des AT1-N10. Im Gegensatz dazu wurde mit demselben Antikörper in equinen Spermatozoen eine **62 kDa**-Bande gefunden (*Sabeur et al., 2000*). In einer vorherigen Studie wies *Vinson et al. (1995b)* eine **60 kDa**-Bande unter Einsatz eines monoklonalen Antikörpers auf humanen Spermatozoen nach. Ein Vergleichstest beider Antikörper könnte den Unterschied zu dem hier dargelegten Ergebnis erklären. Die beschriebenen Unterschiede in der gefundenen Molekularmasse könnten im Übrigen auf die spezieabhängige Glykosilierung und andere posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein.

Erstmals gelang der Nachweis des AT2 auf (humanen)Spermatozoen. Sie befinden sich im Bereich des Akrosoms und sind vermutlich an der Induktion der akrosomalen Reaktion beteiligt (vergl. Köhn et al., 1998). Auch der AT1 konnte nachgewiesen werden, er befindet sich postakrosomal, am Mittelstück und am Flagellum humaner Spermatozoen und ist vermutlich für die Steigerung der Motilität durch AII zuständig. Welche Rezeptoren die Kapazitation beeinflussen ist derzeit noch nicht vollständig geklärt

Die Signaltransduktion im Zusammenhang mit der Akrosomreaktion und der Motilität humaner Spermatozoen ist ebenfalls nicht vollständig geklärt. Weitere Arbeiten sind notwendig, um die Moleküle zu identifizieren, die nach der Aktivierung von AT1 und AT2 durch AII, die Spermatozoenfunktion in der beobachteten Weise beeinflussen.

5. 2. 2. 4. Bewertung

AT1 und AT2 kommen auf humanen Spermatozoen und in anderen Bereichen des männlichen und weiblichen Reproduktionstrakt vor (Siehe Tabelle 21, S. 97). Das rezeptorangepasste Peptid AII ist, wie beschrieben, sowohl im Seminalplasma als auch in der Follikularflüssigkeit nachweisbar. Es hat eine messbare Wirkung auf die Funktion humaner Spermatozoen, diese Wirkungen können durch Rezeptorantagonisten in einer Konstellation verhindert werden, die zu der Rezeptorverteilung, wie sie in dieser Arbeit postuliert wird, konkordant ist.

Da eine hohe Anzahl verschiedener Wachstumsfaktoren die Entwicklung und die Funktion des Hodens beeinflussen und kontrollieren, ist es wahrscheinlich, dass ein Ausschalten eines Faktors (AII-Rezeptoren) zu keinen nennenswerten Funktionseinbusen führt (*Gnessi et al., 1997*). Es handelt sich vermutlich um ein redundantes System, dessen Funktion bei einem Ausfall durch andere Systeme übernommen werden können. Die Studien, die zeigen dass AT1 (*Ito et al., 1995*) und AT2-Knock-Out (*Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995b*) keine wesentliche Einschränkung der Fertilität und sogar der embryonalen Entwicklung aufweisen, lassen sich nicht auf den Menschen übertragen. Zum einen führt ACE-Hemmer-Einnahme während der Schwangerschaft beim Menschen zu Missbildungen auf Grund der Nierenfunktionsstörung mit konsekutivem Oligohydramnion und so genannten Oligohydramnissyndromen, zum anderen ist die Rezeptorverteilung zwischen den Spezies, wie oben ausgeführt, unterschiedlich, sodass ein Knockout für die Maus tolerabel, für den Menschen jedoch fatal sein könnte (Vergl. Bsp. *Drosophila*, S. 102)

Demnach weisen die oben diskutierten Ergebnisse darauf hin, dass AII keine unersetzliche Rolle in der männlichen Fertilität besitzt (Vergl. Auch S. 95ff: Angiotensinogen und ACE-Knock-Out-Mäuse). Dennoch bleibt festzuhalten, dass diese Ergebnisse lediglich bei der Maus erhoben wurden und dass es weiterhin unklar bleibt, welche Rolle AII bei der Hodenentwicklung und -funktion spielt. Tatsächlich hemmt AII nämlich die Aktivität der Adenylylcyclase in Leydigzellen und reduziert die Konzentration an basalem und hCG-stimuliertem cAMP, sowie die Testosteronproduktion in Leydigzellen adulter Ratten (*Khanum & Dufau, 1988*). Die AT-Expression ist altersabhängig, beide Subtypen lassen sich im neonatalen Rattenhoden nachweisen und die Rezeptordichte sinkt altersabhängig in rezeptoruntertypspezifischer Weise.

Insgesamt komplettieren die hier dargestellten Ergebnisse das System des lokalen RAS auf humanen Spermatozoen.

5 . 2. 3. Einfluss von AII auf die Motilität humaner Spermatozoen

Überblick

Viele Substanzen wurden ausfindig gemacht, welche Motilität und Funktion humaner Spermatozoen beeinflussen. Unter den motilitätsfördernden Substanzen sind die Kinine Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen (Sato, 1980; Kaneko & Moriwaki, 1981; Miska & Schill 1990, 1994; Müller et al., 1990; Schill & Miska, 1992; Somlev & Helili, 1996). Andere Substanzen, wie beispielsweise das Methylxanthinderivat Pentoxifyllin, ein Phosphodiesterasehemmer, weisen ebenfalls eine signifikante motilitätssteigernde Wirkung auf (Hellström und Sikka, 1989; Hammitt et al., 1989; Köhn et al., 1993; Airbarg et al., 1994; Stanic, 2002). Auch die in der Steroidsynthese wichtige Aromatase, die in humanen Spermatozoen nachgewiesen werden kann, korreliert positiv mit der Motilität humaner Spermatozoen (Lambard et al., 2003).

AII beeinflusst die Motilität und die Geschwindigkeit humaner Spermatozoen (Vinson et al., 1995, 1996, Kapitel 4. 4.)

5. 2. 3. 1. Eigene Ergebnisse

Diese Arbeit weist erstmals eine Motilitätssteigerung von AII auf humane Spermatozoen nach 15 Minuten, 60 Minuten sowie nach einem Waschschrift nach (siehe Tabelle 22). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der AT1-spezifische Rezeptorblocker Losartan[®], der in der Bluthochdrucktherapie eingesetzt wird (Präparatebeispiel Lorzar[®]), diese Effekte verhindern kann (Tabelle 23). Saralasin, ein unspezifischer AT-Blocker kann die AII- induzierte Motilitätssteigerung ebenfalls verhindern (Tabelle 24). Bemerkenswert ist eine statistisch signifikante Zunahme des Anteils immotiler Spermatozoen nach Zugabe von Saralasin alleine, nach 60 Minuten (5,9%, KI: 2,45%–28,23%), obwohl der Substanz ein partieller Agonismus zugesprochen wird. Dies könnte ein statistischer Effekt sein (Probenumfang, Explorative Datenanalyse mehrerer Parameter), möglich ist aber auch, dass dies durch Saralasin selbst pharmakologisch verursacht wurde oder, dass es sich um einen toxischen Effekt handelt. PD123319, ein AT2-spezifischer Rezeptorblocker hingegen, hat, mit einer Ausnahme, keinen Einfluss auf die AII-induzierte Motilitätssteigerung (Tabelle 25): Nach 15 Minuten ist der Anteil motiler Spermatozoen nach Zugabe von AII und Vorinkubation mit PD123319 signifikant niedriger (11,6%, KI: -0,95%–15,25%), als in der Kontrolle mit AII allein (15,1%, KI: 12,2%–17,2%). Die Ursache für diesen Effekt ist ebenfalls unklar, so könnte PD123319 unter Umständen auch AT1 hemmen. Ein statistischer Effekt ist auch möglich (Probenumfang, Explorative Datenanalyse mehrerer Parameter).

Die Versuche wurden explorativ durchgeführt, von den miterfassten Parametern wurden lediglich die Parameter „immotile Spermatozoen“ und „lokal motile Spermatozoen“ mit berücksichtigt. Die übrigen Parameter (Kreisläufer, Nicht Lineare, Lineare, Hyperaktivierte, VSL, VCL und VAP, siehe S. 53f) konnten leider nicht dargestellt werden, da dies den Rahmen dieser Arbeit weit überschritten hätte. Eine vollständige Auswertung hätte zudem „Multiplem Testen“ entsprochen.

Ein wesentliches Merkmal dieser Untersuchungen ist die adäquate statistische Auswertung: In den bisherigen Veröffentlichungen wurde meist ein Student-t-Test, also ein parametrischer Test verwendet. Die meisten physiologischen Parameter, so auch die Motilitätsparameter humaner Spermatozoen sind jedoch nicht standardnormalverteilt, so dass ein parametrischer Test zu falschen Ergebnissen führt. In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Boedecker und Frau Scheibelhut von der Arbeitsgruppe „Medizinische Statistik“ am Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen, wurden die Daten untersucht und adäquat ausgewertet.

| AII % Immotile | 15min | | 60min | | W |
|-----------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | AII 10 ⁻⁷ | AII 10 ⁻⁹ | AII 10 ⁻⁷ | AII 10 ⁻⁹ | AII 10 ⁻⁹ |
| Probanden | -5 | -3,8 | -7 | -13,05 | -12,33 |
| KI | -1,25-- 8,35 | 0,35 --8,2 | -3,4-- 10,15 | -9,25 -- - 21 | 16,85 -- -16,41 |
| Signifikanz | + | - | + | + | + |
| Patienten | -4,15 | -4,7 | -6,65 | -11,3 | -18,52 |
| KI | 1,8--4,4 | 0,45--9,35 | 0,05--13,35 | -2,65 -- - 28,95 | -8,59 -- -28,44 |
| Signifikanz | - | - | - | - (Streuung) | + |
| Anmerkung | <i>Tendenz zur Abnahme des Anteils immotiler Spermatozoen erkennbar. Signifikanz vermutlich durch höhere Zahl n erzielbar.</i> | | | | |
| % Lokal Motile | | | | | |
| Probanden | -1,7 | -3,15 | -4,3 | -5,8 | -1,8 |
| KI | 0,85--3,9 | -1,5--4,75 | -1,5--6,4 | -3,35--7,85 | 1,4--4,7 |
| Signifikanz | - | + | + | + | - |
| Anmerkung | <i>Tendenz zur Abnahme des Anteils immotiler Spermatozoen erkennbar. Signifikanz vermutlich durch höhere Zahl n erzielbar.</i> | | | | |
| Patienten | -2,4 | -2,15 | -4,1 | -4,7 | -3,95 |
| KI | -0,1--5,65 | 1,8 | -0,35--6,95 | -2,55--9,4 | -1--6,2 |
| Signifikanz | - | - | + | - | + |
| Anmerkung | <i>Tendenz zur Abnahme des Anteils immotiler Spermatozoen erkennbar. Signifikanz vermutlich durch höhere Zahl n erzielbar</i> | | | | |
| % Motile | | | | | |
| Probanden | 6,6 | 7,2 | 10,35 | 19,45 | 14,03 |
| KI | 3,2--11 | 4--10,45 | 7,7-- 14,25 | 16,5--22,45 | 10,86--16,56 |
| Signifikant +/- | + | + | + | + | + |
| Anmerkung | Der Wert 19,45% ist auch gegenüber den anderen Werten signifikant | | | | |
| Patienten | 5,05 | 6,5 | 11,75 | 14,9 | 22,58 |
| KI oben | -2,1-- 9,3 | 2,5--10,45 | 4,05-- 18,2 | -1,6--31,35 | 12--34,08 |
| Signifikanz +/- | + | + | + | +(Streuung) | + |

Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse der Motilitätsmessungen an humanen Spermatozoen. Explorative Datenanalyse. Abweichungen vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle in %. (Probanden, n=22, Patienten, n=17); Hodges-Lehmann-Schätzer und Konfidenzintervall (KI), modifizierter Wilcoxon-Test. Signifikant ist ein Wert, dessen KI den Leerwert nicht miteinschließt. Zur Signifikanz zwischen den Gruppen Probanden und Patienten sowie zwischen den einzelnen Messzeitpunkten siehe Text.

| Losartan® | 15Min | | | 60Min | | | W | |
|--------------------------------|--|-----------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|-------------------|----------------|
| | AII | Los | AII+Los | AII | Los | AII+Los | AII | AII+Los |
| Δ % <i>Immotile</i> | -12,05 | -0,2 | -2,4 | -13,85 | 2,8 | 4 | -19,2 | 1,15 |
| KI | -5,5--16,15 | - 12,9--7,6 | -10,4--5,8 | 18,5 --8,1 | -0,85-- 6,2 | - 1,45--8,75 | -24,55-- 12,75 | -7,4 -- 7,3 |
| Signifikanz | + | - | - | + | - | - | + | - |
| Anmerkung | Nicht signifikant bedeutet hier, dass der Wert zum <u>Leerwert</u> nicht signifikant ist, somit wird der Effekt von AII durch Zusatz von Losartan® aufgehoben. | | | | | | | |
| Δ % <i>Lokal Motile</i> | -2,65 | 0,95 | 2,6 | -4,6 | -2,9 | -3,65 | -1,55 | -0,8 |
| KI | -7,3 -- 0,8 | - 4,75--6,1 | -3,3--11,1 | -14,8--5,1 | - 8,6--3,1 | - 9,5--10,05 | -5,55--4,45 | - 5,55--6,2 |
| Signifikanz | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Anmerkung | Da AII hier keinen Effekt zeigt, kann ein Einfluss von Losartan auf einen durch AII induzierten Effekt nicht beurteilt werden. Losartan alleine hat keinen Einfluss auf diesen Parameter | | | | | | | |
| Δ % <i>Motile</i> | 14,25 | 0,85 | 1 | 16,85 | -1,05 | -1,75 | 20,75 | 2,2 |
| KI | 11,65--16,55 | -1,35-- 2,55 | - 2,45--4,95 | 14,95--19,3 | -3--0,6 | -4,1--0,6 | 15,45--24,75 | 3,15--5,6 |
| Signifikanz | + | - | - | + | - | - | + | - |
| Anmerkung | Nicht signifikant bedeutet hier, dass der Wert zum Leerwert nicht signifikant ist, somit wird der Effekt von AII durch Zusatz von Losartan® aufgehoben. | | | | | | | |

Tabelle 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der Motilitätsmessungen an humanen Spermatozoen unter Zusatz von Losartan. Explorative Datenanalyse. Abweichungen vom Leerwert nach der Formel: Messwert - Leerwert = Δx = Wert in der Tabelle in %. (n=10); Hodges-Lehmann-Schätzer und Konfidenzintervall (KI), modifizierter Wilcoxon-Test. Signifikant ist ein Wert, dessen KI den Leerwert nicht miteinschließt. Das bedeutet allerdings, dass ein nicht-signifikanter Unterschied anzeigt, dass Losartan den Effekt von AII verhindert.

Der Einsatz der Rezeptorblocker gibt konkrete Hinweise auf die beteiligten Rezeptoren. Demnach wird die belegte Motilitätszunahme durch AII über AT1 vermittelt. Dieser Effekt kann durch **Losartan®**, einen spezifischen AT1-Blocker verhindert werden, mit einer Ausnahme jedoch nicht durch PD123319, einen spezifischen AT2-Blocker. Hingegen konnte in früheren Untersuchungen belegt werden, dass spezifische AT2-Blocker die Induktion der AR durch AII verhindern können (Köhn et al., 1998). Diese Ergebnisse korrelieren zu den hier dargestellten Ergebnissen der Immunzytochemie und des Immunoblots, die den AT1 postakrosomal, am Mittelstück sowie am Flagellum humaner Spermatozoen nachweisen, den AT2 jedoch lediglich im Bereich des Akrosoms.

| Saralasin | 15 Min | | | 60 Min | | | W | |
|---------------------------|---|----------------|----------------|-----------------|----------------|------------|------------------|----------------|
| | AII | Sara | AII+Sara | AII | Sara | AII+Sara | AII | AII+Sara |
| Δ % Immotile | -14,15 | 0,15 | -1,05 | --13,85 | 5,9 | 1,95 | -18,95 | -5,5 |
| KI | -19,05-- 7,8 | - 9,55-9,45 | - 6,05-7,65 | -18,15-- 8,1 | 2,45-28,23 | -0,8-20,83 | -22,7-- 12,75 | - 12,95-0,1 |
| Signifikanz | + | - | - | + | (+) | - | + | - |
| Anmerkung | -(+): Saralasin führt alleine hinzugegeben zu einer signifikanten Immotilitätszunahme, Ursache unklar. -Nicht signifikant bedeutet hier, dass der Wert zum Leerwert nicht signifikant ist, somit wird der Effekt von AII durch Zusatz von Saralasin aufgehoben | | | | | | | |
| Δ %Lokal Motile | -2,8 | -1,45 | -0,4 | -2,45 | -2,8 | -2,1 | -0,75 | -0,95 |
| KI | -7,3-0,8 | -6,3-4,3 | 10--4,1 | -7,8-1,5 | -9-0,95 | -6,9-1,95 | -5,55-4,45 | 5,2-3,2 |
| Signifikanz | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Anmerkung | Weder AII noch Saralasin bewirken eine signifikante Modifikation des Anteils lokal motiler Spermatozoen. Da AII hier keinen Effekt zeigt, kann ein Einfluss von Saralasin nicht beurteilt werden | | | | | | | |
| Δ % Motile | 15,1 | 1,45 | 0,4 | 17,2 | -0,75 | 2,95 | 18,2 | 19 |
| KI unten | 12,2-17,2 | -2,4-4,9 | - 5,5-4,95 | 14,7-18,35 | - 3,35-2,15 | 0,65-5,7 | 14,75-12,35 | 4-33 |
| Signifikanz | + | - | - | + | - | + | + | + |
| Anmerkung | Ähnlicher Effekt wie Losartan, nach 60 Minuten kann Saralasin den Einfluss von AII jedoch nicht vollständig blockieren. Nach einem Waschschrift gibt es keinen statistischen Unterschied zwischen den beiden Werten. | | | | | | | |

Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der Motilitätsmessungen an humanen Spermatozoen unter Zusatz von Saralasin. Explorative Datenanalyse. Abweichungen vom Leerwert nach der Formel: $\text{Messwert} - \text{Leerwert} = \Delta x = \text{Wert in der Tabelle in \%}$. ($n=10$); Hodges-Lehmann-Schätzer und Konfidenzintervall (KI), modifizierter Wilcoxon-Test. Signifikant ist ein Wert, dessen KI den Leerwert nicht miteinschließt. Das bedeutet allerdings, dass ein nicht-signifikanter Unterschied anzeigt, dass Saralasin den Effekt von AII verhindert.

Saralasin ist ein unspezifischer AT-Blocker, somit sollte, bezüglich der Motilität, der Effekt mit dem von Losartan[®] vergleichbar sein. Insgesamt lässt sich diese Vermutung bestätigen, wenn auch auffällt, dass Saralasin die AII-induzierte Motilitätszunahme nach 60 Minuten und somit auch nach einem Waschschrift nicht vollständig verhindern kann (Tabelle 23). Interessanterweise nimmt unter Saralasin der Anteil immotiler Spermatozoen nach 60 Min. signifikant zu. Neben statistischen und methodischen Gründen, könnte ein pharmakologischer oder toxischer Effekt ursächlich sein. Weitere Studien wären notwendig, um diesen Effekt zu untersuchen. Eine solche Studie sollte dann konfirmatorisch durchgeführt werden.

| PD123319 | 15Min | | | 60Min | | | W | |
|--------------------------------|---|---------------|-----------------|-----------------|-----------|-------------|--------------|-------------|
| | AII | PD | AII+PD | AII | PD | AII+PD | AII | AII+PD |
| $\Delta\%$ <i>Immotile</i> | -12,75 | -0,55 | -8,85 | -13,85 | 4,3 | -7,2 | -18,95 | -14,8 |
| KI | -16,55-- 5,5 | -5-5,05 | -15,55-- 2,9 | -18,15-- 8,1 | 0,8-7,25 | -15,3--3,3 | -22,7--12,75 | -19,1--6,75 |
| Signifikanz | + | - | + | + | - | + | + | + |
| Anmerkung | PD123319 kann den Effekt von AII auf den Anteil immotiler Spermatozoen nicht verhindern. | | | | | | | |
| $\Delta\%$ <i>Lokal Motile</i> | -2,8 | -0,9 | -4,05 | -2,45 | -2,8 | -5,7 | -0,75 | 0 |
| KI | -7,3-0,8 | - 6,6-3,35 | -7,1-1,55 | -7,8-1,5 | -5,9-0,4 | -9,05-1,7 | -5,55-4,45 | -5,8- 5,9 |
| Signifikanz | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Anmerkung | Da AII hier keinen Effekt zeigt, kann ein Einfluss von PD123319 auf einen durch AII induzierten Effekt nicht beurteilt werden. Selbst hat PD123319 keine Auswirkung auf diesen Parameter. | | | | | | | |
| $\Delta\%$ <i>Motile</i> | 15,1 | 1,4 | 11,6 | 17,2 | -0,55 | 14,15 | 18,2 | 15,4 |
| KI | 12,2-17,2 | 0,5-3 | - 0,95-15,25 | 15,7-18,35 | 1,95-0,75 | 11,45-16,15 | 14,75-24,05 | 12,2-19,1 |
| Signifikanz | + | - | -!!! | + | - | + | + | + |
| Anmerkung | Der mit ! gekennzeichnete Wert belegt eine statistisch gesicherte Hemmung der Motilitätssteigerung durch AII, durch PD123319. Dies beruht am ehesten auf einen Streuungsartefakt. Der Median zeigt, dass AII trotz PD123319 die Motilität steigert. Dennoch bleibt dieser Wert bemerkenswert. | | | | | | | |

Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse der Motilitätsmessungen an humanen Spermatozoen unter Zusatz von PD123319. Explorative Datenanalyse, Werte sind die Abweichungen vom Leerwert nach der Formel: $\text{Messwert} - \text{Leerwert} = \Delta x = \text{Wert in der Tabelle in } \%$. ($n=10$); Hodges-Lehmann-Schätzer und Konfidenzintervall (KI), modifizierter Wilcoxon-Test. Signifikant ist ein Wert, dessen KI den Leerwert nicht miteinschließt.

PD123319 ist ein spezifischer Rezeptorblocker für den AT2. Mit Berücksichtigung der Ergebnisse der Immunzytochemie sollte dieser also keinen Einfluss auf die Motilitätszunahme durch AII haben. Dies wurde in den meisten Fällen auch bestätigt (Tabelle 25). Interessanterweise wurde die AII-induzierte Zunahme des Anteils motiler Spermatozoen nach 15 Minuten jedoch signifikant gehemmt. Die Ursache hierfür ist ebenfalls unklar. Auch hier wäre eine entsprechende konfirmatorische Untersuchung notwendig, um einen tatsächlichen Effekt nachzuweisen.

5. 2. 3. 2. Literatur

In den Studien von *Vinson et al.* (1995 und 1996) betragen die Motilitätssteigerungen nach Zugabe von AII ca. 20% (*Vinson et al.*, 1995). In der Kontrolle betrug die Motilität nach 10 Minuten etwa 47%, nach Zugabe von AII etwa 70%. In einigen Fällen betrug die

Motilitätszunahme sogar noch mehr: In einer einzelnen Probe zeigte sich eine **Motilitätssteigerung um fast 40%** nach fünf Minuten (Vinson *et al.*, 1995) und in einem anderen Versuch um fast 30% nach 30 Minuten (Vinson *et al.*, 1996). (Die Kontrolle wies nach 30 Minuten noch etwa 10% Motilität auf, nach AII-Zugabe noch 40%). Die **Geschwindigkeit stieg von ca. 14µm/s auf ca. 28µm/s (also um 100%!).** In den gleichen Publikationen wurde der Einfluss von Losartan[®] auf die Motilität humaner Spermatozoen untersucht. Losartan[®] hemmte die Wirkung von AII, den Anteil motiler Spermatozoen zu erhöhen (Vinson *et al.* 1995, 1996). In einigen Proben wurde sogar ein **statistisch signifikanter inhibitorischer Effekt auf den Anteil motiler Spermatozoen von Losartan[®]** alleine festgestellt (Vinson *et al.*, 1995). Die Beobachtung wurde damit erklärt, dass wahrscheinlich Spermatozoen bereits durch endogenes AII stimuliert werden und dieser Effekt durch Losartan[®] geblockt wird. Dies erscheint unter der Vorstellung, dass die Spermatozoen in der Aufbereitung vom Seminalplasma weitgehend getrennt wurden und endogenes AII im Seminalplasma nicht stabil ist (eigene, nicht veröffentlichte HPLC-Untersuchungen) jedoch unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist ein statistischer Effekt:

Die genannte Studie verwendet einen parametrischen Test bei nicht standardnormalverteilten Parametern. Weiterhin liegt vermutlich eine explorative Datenanalyse vor (Hinweis ist die Anzahl der getesteten Parameter), somit kann ein solcher Wert auch zufällig generiert sein. Sollte die Studie konfirmatorisch durchgeführt worden sein (Hinweise darauf wurden in der Publikation nicht gegeben), so würde dies „Multiplen Testen“ entsprechen.

In der vorliegenden Arbeit konnte tendenziell der gleiche Effekt nach 60 Minuten Inkubation beobachtet werden. Der Anteil motiler Spermatozoen sank unter den Kontrollwert (-1,75%), ohne jedoch statistisch signifikant zu sein (S. 85: Tabelle 13, Abb. 35; S. 123, Tabelle 22). In der Arbeit von Vinson *et al.* (1995) wurde auch AI getestet, welches die Motilität um ca. 10% steigerte. Dieser Effekt konnte durch den ACE-Hemmer Captopril verhindert werden, statistisch waren die Ergebnisse signifikant (n=10, p<0,05, allerdings wieder Student-t-Test). Dies stimmt mit anderen Ergebnissen jedoch nicht überein, die belegen, dass **ACE-Hemmer testiculäres ACE nicht inhibieren können** (Jackson *et al.*, 1987, Johnston *et al.*, 1988, Sakaguchi *et al.*, 1988).

5. 2. 3. 3. Vergleich und Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit weist ebenfalls eine Motilitätssteigerung nach Zugabe von AII um bis zu 19,45% in der Probandengruppe und 14,9% in der Patientengruppe nach (Tabelle 10, Abb. 31 und 32, S. 79f). Im Unterschied zu den bisherigen Publikationen erfolgte die statistische

Auswertung mit einem nicht-parametrischen Test. Dieser Unterschied ist eminent, da ein parametrischer Test in diesem Fall unzulässig ist:

Motilitätsparameter humaner Spermatozoen sind nicht standardnormalverteilt!

Streng genommen sind zumindest die statistischen Ergebnisse der genannten Studien somit ungültig (zur Erläuterung siehe bitte Anmerkung am Ende des Kapitels).

Die Geschwindigkeitszunahme konnte ebenfalls, auch statistisch, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Unter den dargestellten Ergebnissen war lediglich die Motilitätszunahme in der Probandengruppe statistisch nachweisbar, da die Streuung in der Patientengruppe sehr groß war. Eine **Streuung der Ergebnisse in der Patientengruppe** fiel bereits in den ELISA-Untersuchungen auf (Siehe Kapitel 5. 2.). In beiden Fällen kann dies damit zusammenhängen, dass die Ejakulate der andrologischen Patienten erst **nach der Routinediagnostik** für die Versuche verwendet wurden. Da dies unterschiedlich lange Zeit in Anspruch nahm, entsprach die Zeit bis zur Aufbereitung nicht der verwendeten Zeit in der Probandengruppe (Größenbereich der Zeitdifferenz 10 Minuten). Dies könnte mitunter die größere Streuung der Werte in der Patientengruppe erklären (Kapitel 4.4). Nach einem Waschschrift betrug die Differenz in der Probandengruppe etwa 14,03% zum Leerwert. Es muss angemerkt werden, dass der Motilitätsunterschied nach dem Waschschrift nicht einer Motilitätszunahme entspricht. Teilweise war die absolute Motilität niedriger als nach 60 Minuten. Lediglich die Differenz zum Leerwert war in einigen Versuchen größer. Der größte Unterschied ließ sich in der Patientengruppe verzeichnen. Hier betrug die Differenz zum Leerwert 22,58% nach dem Waschschrift (Tabelle 10, Abb. 31 und 32, S. 79f). Es ist bekannt, dass die **Waschprozedur** einen **schädigenden Effekt auf Spermatozoen** aufweist (Makler & Jacobi, 1981). Die hier gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass **AII** einen **protektiven Effekt** diesbezüglich haben könnte. Entsprechend könnten vor allem Paare, die IUI und IVF in Anspruch nehmen, von einer AII-Zugabe zu den entsprechenden Ejakulaten profitieren.

Statistisch konnte ein Unterschied zwischen den Motilitätsparametern humaner Spermatozoen von Probanden und andrologischen Patienten in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, der jedoch weitgehend durch die höhere Streuung der Werte in der Patientengruppe erklärt werden kann (auf die Darstellung entsprechender vergleichender Graphen wurde daher verzichtet). Um den Unterschied herauszuarbeiten, wäre eine konfirmatorische Untersuchung notwendig.

Die Reduktion des Anteils immotiler Spermatozoen entsprach nicht dem Kehrwert der Motilitätssteigerung, auch wenn diese statistisch ebenfalls nachweisbar war (Tabelle 8, Abb. 27 und 28, S. 75f). Dies geht vermutlich daraus hervor, dass ein Teil der stimulierten Spermatozoen aus dem Anteil der lokal motilen Spermatozoen rekrutiert wurden (Vergl.

Tabelle 22, S. 122). Der Anteil immotiler Spermatozoen wurde durch AII nach 15 Minuten um 12,05% und nach 60 Minuten um 13,85% gesenkt (Tabelle 22). Nach dem Waschschrift betrug die Differenz zum Leerwert -12,33% und die Motilitätszunahme durch AII in diesen Versuchen 14,03%, (Tabelle 22).

Der **Anteil lokal motiler Spermatozoen** wurde durch die zugesetzten Substanzen prozentual nicht nennenswert verändert (Tabelle 22, S. 122). Auch hier bestätigte sich zwar die Tendenz der Abnahme des Anteils an lokal motilen Spermatozoen durch die Zugabe von AII nach 60 Minuten, wie unter 4. 4. 1. beschrieben, jedoch streuen die Werte derart, dass die Ergebnisse keinen statistischen Unterschied aufweisen. Auch zwischen den einzelnen Werten gibt es statistisch keine Unterschiede. Dabei kann es jedoch sein, dass nicht die gleichen Spermatozoen nach AII-Zugabe zu der Fraktion der lokal motilen Spermatozoen gehört:

Die Motilitätszunahme durch AII ist nur dadurch möglich, dass entsprechende Spermatozoen aus den Fraktionen der immotilen und lokal motilen Spermatozoen rekrutiert werden. Genauso ist es denkbar, dass ein Teil der immotilen Spermatozoen in den Anteil der lokal motilen Spermatozoen aufrückt. Somit ist es durch Motilitätsmessung an einer heterogenen Spermatozoenpopulation nicht eruierbar, was isoliert mit dem Anteil lokal motiler Spermatozoen geschieht.

Die vorangehend beschriebenen Beobachtungen gelten entsprechend für die Versuche mit den Rezeptorantagonisten Losartan[®] (AT1), Saralasin (AT1 und AT2) und PD123319 (AT2) (Kapitel 4. 4. 3.). Diese Versuchsreihe, die zeitlich getrennt zu den gerade beschriebenen Versuchen erfolgte, erforderte einen Vergleichswert der Stimulation der Motilität durch AII, der erneut die Motilitätssteigerung der vorangehenden Versuche belegte. Der Anteil motiler Spermatozoen wurde durch Zugabe von AII nach 15 Minuten um 14,25% gegenüber der Negativkontrolle gesteigert (S. 83f: Tabelle 12, Abb. 34, S. 123, Tabelle 23). Nach 60 Minuten betrug die Differenz 16,85% und nach einem Waschschrift 20,75% gegenüber dem Leerwert. Diese Unterschiede konnten statistisch belegt werden. Die Ursachen für die Unterschiede zu den vorangehenden Untersuchungen sind weitgehend unklar. Neben methodischen Unterschieden, sind weitere Faktoren wie Probenumfang, unterschiedliche Chargen der verwendeten Peptide und unterschiedliche Probanden denkbar.

Unter Inkubation mit Losartan[®] blieb ein motilitätssteigernder Effekt von AII zu allen Zeitpunkten aus (Tabelle 23, S. 123). Dies entspricht den Ergebnissen von Vinson et al. (Vinson et al., 1995 und 1996) Losartan[®] selbst hatte hingegen keinen erkennbaren Effekt auf den Anteil motiler Spermatozoen. Lediglich nach dem Waschschrift in HTF-1%HSA zeigt sich eine diskrete Zunahme des Anteils motiler Spermatozoen von 2,2%, trotz Zugabe von

Losartan[®], die jedoch statistisch einer zufälligen Streuung entspricht. Der Messwert für Losartan[®] einerseits und AII-Zugabe nach Inkubation mit Losartan[®] entspricht in Abbildung 37 in etwa dem Leerwert, die Differenz streut daher nahe um den 0-Wert. Dies deutet an, dass die Substanz (hier Losartan[®] 10⁻⁷M), keine Wirkung auf den aufgeführten Parameter hat. Losartan[®] verhinderte also die Abnahme des Anteils immotiler Spermatozoen durch AII in der Probe. Nach 15 Minuten zeigte sich eine Reduktion um 2,4%, die statistisch jedoch nicht signifikant war, nach 60 Minuten ist dieser Effekt noch deutlicher, es zeigt sich sogar eine Zunahme des Anteils immotiler Spermatozoen um 4%, es besteht allerdings kein statistischer Unterschied. Im Gegensatz zu dem Wert nach 15 Minuten war nach 60 Minuten der Unterschied zwischen dem Wert „AII“ und „AII+Los“ auch statistisch signifikant. Die angefügten Waschschriffe demonstrierten, dass die einmal induzierten Effekte, durch die Entfernung des Agens (AII, Losartan[®]+AII etc.) nicht rückgängig gemacht werden konnten. Im Gegensatz zum hochspezifischen AT1-Antagonisten Losartan[®], blockiert **Saralasin** unselektiv AII-Rezeptoren, also AT1 und AT2 (Tabelle 14, Abb. 40). Peterson et al. (1993) konnten nachweisen, dass Saralasin an isolierten Ovarien die Ovulation hemmen kann. Dies impliziert eine Bedeutung des RAS für die Modulation der Ovulation (*Peterson et al., 1993*). Der Effekt von Saralasin auf den Anteil immotiler Spermatozoen war vergleichbar mit dem von Losartan[®] (Tabelle 24, S. 124). Die Senkung des Anteils immotiler Spermatozoen durch AII betrug nach 15 Minuten 14,15%, sie wurde durch Saralasin aufgehoben. Die statistisch belegte Zunahme des Anteils immotiler Spermatozoen um 5,9% nach 60 Minuten könnte auf eine motilitätshemmende Wirkung von Saralasin hinweisen, weitere Studien wären jedoch notwendig, um einen tatsächlichen Effekt nachzuweisen (Vergl. S. 124).

Der Anteil lokal motiler Spermatozoen wurde in den vorhergehenden Untersuchungen durch AII gesenkt (S. 77f: Tabelle 9, Abb. 29 und 30). Saralasin hemmte die Wirkung von AII (S. 87f: Tabelle 15, Abb. 37). In dieser Versuchsreihe zur Beurteilung des Effektes von Saralasin auf die Senkung des Anteils lokal motiler Spermatozoen durch AII zeigte AII keinen statistisch belegbaren Effekt auf die Reduktion des Anteils lokal motiler Spermatozoen. Die Probandenzahl in beiden Fällen war allerdings nicht gleich. Der Anteil lokal motiler Spermatozoen war jedoch unter Saralasinzusatz vor AII-Inkubation tendenziell geringer als unter Losartan[®]-Zugabe. **Dies bedeutet, dass AII seine Wirkung, den Anteil lokal motiler Spermatozoen zu senken, unter Saralasinzugabe stärker ausüben kann, als unter Losartan[®]- Zusatz** (S. 83: Tabelle 12, Abb. 34). Saralasin hemmte weiter die motilitätssteigernde Wirkung von AII (S. 89: Tabelle 16, Abb. 38; S. 124, Tabelle 24). Dieser Effekt war zunächst (nach 15 Minuten) genauso ausgeprägt wie unter Zugabe von Losartan[®]. Nach 60 Minuten zeigt sich jedoch eine signifikante Zunahme der Motilität von 2,95%. Nach

dem Waschschrift in HTF 1%HSA betrug die Motilitätssteigerung sogar 19,0%. Saralasin hemmt den Effekt von AII nach einer Stunde somit nicht mehr. Dies könnte darauf hinweisen, dass **Saralasin nicht so effektiv AT1 blockiert, wie Losartan®** (Vergl. Tabelle 23 und 24).

PD123319 ist ein spezifischer AT2-Antagonist. Effekte auf die durch AII induzierten Motilitätsänderungen humaner Spermatozoen konnten in den vorliegenden Versuchen statistisch, mit einer Ausnahme, nicht nachgewiesen werden (S. 125f, Tabelle 25). B123319 alleine zeigte keine erkennbaren Effekte auf die Motilitätsparameter humaner Spermatozoen.

5. 2. 3. 4. Bewertung

Wie eingangs beschrieben gelten die Parameter **Motilität und Geschwindigkeit als positive prediktive Parameter für die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft auf physiologischem und „künstlichem“ Wege** (*Mahadevan und Trounson, 1984; Holt et al., 1985; Hinting et al., 1988; Grunert et al., 1989; Bongso et al., 1989; Vantman et al., 1989; Barlow et al., 1991; Tucker et al., 1991; Hinney et al., 1993; Morales et al., 1993; Larsen et al., 2000*). Geschwindigkeit und Anteil progressiv motiler Zellen lässt sich mit der Rate erfolgreicher IUI und IVF korrelieren (Bollendorf et al., 1996). Grunert et al. (1998) wiesen eine signifikante Verschlechterung der Fertilisierungsraten in der IVF bei einer Globalmotilität unter 30% nach.

Die hier dargestellten Untersuchungen wurden **explorativ** durchgeführt, daher besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass statistische Unterschiede zufällig generiert wurden. Eine konfirmatorische Studie wäre notwendig, um die Irrtumswahrscheinlichkeit zu berechnen und somit die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Ergebnisses zu minimieren.

Tatsächlich scheinen **die meisten Studien** zu Motilitätsuntersuchungen an humanen Spermatozoen **explorativ durchgeführt** worden zu sein: Es wird **keine 0-Hypothese** oder H1-Hypothese beschrieben. Weiterhin werden stets **mehrere Parameter** mit weiteren Variablen (Losartan, Patienten/Probanden, verschiedene Zeitpunkte, verschiedene Konzentrationen der zugesetzten Substanzen) in der gleichen Studie untersucht, was den Charakter Multiplen Testens aufweist. Dennoch wird stets eine Irrtumswahrscheinlichkeit p , meist mit 0,05 als Grenze angegeben. Dieses **Signifikanzniveau ist jedoch nicht pauschal gültig** und wird normalerweise vor Durchführung einer Studie berechnet. Hinweise darauf ergeben sich in den recherchierten Literaturstellen jedoch nicht. Weiterhin wird meist eine Normalverteilung vorausgesetzt, die tatsächlich bei den meisten physiologischen Parametern nicht besteht (abgeleitet aus Gesprächen mit Herrn Dr. Boedecker und Frau Scheibelhut von der Arbeitsgruppe „Medizinische Statistik“ am Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen).

Die vorliegende Arbeit wurde aus diesem Grund explorativ ausgewertet. Eine explorative Datenanalyse dient dem Finden von Parametern, die möglicherweise statistische Unterschiede aufweisen, somit kann man die Anzahl eingrenzen. Diese werden für gewöhnlich anschließend in konfirmatorischen Untersuchungen explizit analysiert. Auf diese Analyse musste aus Zeitgründen leider verzichtet werden.

Dennoch sind die vorliegenden Ergebnisse adäquat ausgewertet worden und stellen somit eine wesentliche Grundlage und eine Voraussetzung für weitere Untersuchungen dar. In diesen Untersuchungen sollte eine konfirmatorische Studie sorgfältig geplant werden (zum Beispiel in Zusammenarbeit mit einem statistischen Institut) und anschließend durchgeführt werden. Dies wäre daher bedeutsam, da aus den genannten Gründen derzeit (vorbehaltlich eventuell aktuell veröffentlichter Studien) vermutlich **keine statistisch gültigen Publikationen zum Einfluss von AII auf die Motilitätsparameter humaner Spermatozoen** existieren.

Respektive dieser statistischen Diskrepanzen gilt für alle Studien, dass die Zahlen für sich sprechen und AII die Motilität humaner Spermatozoen erhöhen kann. **Die statistische Auswertung kann bei diesem offensichtlichen Unterschied als Formalkriterium betrachtet werden.**

Ungeachtet des Interesses an validen Ergebnissen ist der Bedarf an Medikamenten und Substanzen zur Erhöhung der Effektivität assistierter Reproduktion zu betrachten:

AII stellt als physiologisches Peptid, das in physiologischer Konzentration die beobachteten Effekte bewirkt eine Substanz mit optimalen Eigenschaften zur Untersuchung im humanen Modell im Rahmen klinischer Studien dar. Der Zusatz von AII zur Probe stellt weder einen zusätzlichen, behindernden Zeitaufwand, noch einen wesentlichen Kostenfaktor dar. Systemische Auswirkungen oder gar unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) sind somit unwahrscheinlich, da die Substanzen den Spermatozoen zugesetzt werden könnten (zum Beispiel vor einem obligatorischen Waschschrift im Rahmen der Aufbereitung für die Methoden der assistierten Reproduktion) und zum Zeitpunkt des Kontakts mit der Frau gar nicht oder kaum noch in der Probe vorhanden wäre. Unter der unwahrscheinlichen Vorstellung, dass systemische Auswirkungen eintreten würden, stünde mit der Gruppe der AT1-Antagonisten eine wirksame und schnelle Behandlungsoption für z.Bsp. hypertensive Reaktionen etc. zur Verfügung.

Ein theoretisch bedingt wichtiger Gedanke ist, dass durch den Zusatz von AII ein anderes Spermatozoon die Eizelle befruchtet, als ohne Zusatz von AII. Es würde somit ein anderes Individuum, mit anderem Phänotyp entstehen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Methoden der assistierten Reproduktion aber genau dieses sowieso tun, ist dieser philosophische Gedanke vernachlässigbar.

Ungeachtet dessen hat die Medizin eine Verantwortung, die der Untersuchung am Menschen, oft die Untersuchung im Tierversuch voranstellt. Problematisch ist hierbei die unterschiedliche Rezeptordistribution verschiedener Spezies. Das Versuchstier müsste auf diese und auf die Effekte, die durch AII vermittelbar sind, untersucht werden. Am günstigsten wäre ein Versuch an Primaten, sofern die genannten Voraussetzungen gegeben sind. Hierbei sollte der Ablauf der Methoden der assistierten Reproduktion am Menschen genau simuliert werden.

Sollte sich eine Steigerung der Schwangerschaftsraten in den Methoden der assistierten Reproduktion durch Zugabe von AII bestätigen, stünde eine kostengünstige, vermutlich praktisch nebenwirkungsfreie Therapieoptimierung zur Verfügung, die mehr ungewollt kinderlosen Paaren helfen könnte und zusätzlich zur Einsparung von Ressourcen führen würde.

5. 3. Schlussfolgerung und abschließende Bewertung

AII lässt sich in einer Konzentration von ca. 1ng/ml im Seminalplasma nachweisen (Tabelle 5, Abb. 23 und 24). Diese Ergebnisse sind nicht konkordant zu den Ergebnissen in der Literatur (*O'Mahony et al., 2000, Zheng et al., 2003*). In der Arbeit von *O'Mahony et al.* (2000) wurde die Konzentration auf 51.6 ± 9.3 pg/ml bestimmt. Die Gründe für den enormen Unterschied können in der unterschiedlichen Methode (RIA in den zitierten Publikationen, ELISA in der vorliegenden Arbeit), vor allem aber in der unterschiedlich langen Probenaufbereitung liegen, da AII im Seminalplasma sehr schnell durch unspezifische Peptidasen abgebaut wird (Kapitel 1. 4. 1 und eigene, nicht dargestellte HPLC-Untersuchungen). Die Konzentration von 1ng/ml entspricht zudem auch der Michaelis-Konstante des AT1, wäre also physiologisch auf den Rezeptor abgestimmt. Entgegen der Vermutung der zitierten Autoren, lässt sich durch die Untersuchung vasktomierter, vorher fertiler Männer, der Hoden als Hauptproduktionsort des AII im Seminalplasma, ausschließen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Wirkung von AII auf die Motilität durch die Stimulations- und Blockierungsversuche mittels CASA (Kapitel 4.4), wie sie bereits von

Vinson et al. beschrieben wurden, bestätigt werden (Vinson et al., 1995 und 1996). Die Motilität ließ sich unter Einsatz von AII in einer Konzentration von 10^{-9} M und 19,45% nach 60 Minuten in der Gruppe gesunder Probanden signifikant steigern. In der Gruppe der andrologischen Patienten betrug die Motilitätssteigerung nach 60 Minuten 14,9%, der Unterschied war jedoch auf Grund der größeren Streuung nicht signifikant (Tabelle 10, Abb. 31 und 32). Anders als in den zitierten Arbeiten wurde hier jedoch die Tatsache berücksichtigt, dass es sich bei Motilitätsparametern um nicht standardnormalverteilte Parameter handelt. Durch den immunocytochemischen Nachweis von AT1 im Bereich von Mittelstück und Flagellum (Kapitel 4.1) sowie mittels Western-Blot (Kapitel 4.2, Kapitel 5. 3.) konnte ebenso AT1 nachgewiesen werden. Dies lässt auf Grund der Verhinderung der Motilitätssteigerung durch AII unter Einsatz von Losartan[®], die Aussage zu, dass AT1 für die Vermittlung der Motilitätssteigerung durch AII zuständig ist (Vinson et al. 1995, Kapitel 5. 3, Abb. 47, siehe auch weiter unten in diesem Kapitel). Entsprechend den Ergebnissen von Vinson et al. (1995), konnte der beobachtete Effekt von AII auf die Motilität humaner Spermatozoen durch Losartan[®] vollständig gehemmt werden (Tabelle 13, Abb. 39). Der Vergleich der drei Rezeptorantagonisten Losartan[®], Saralasin und PD123319 untereinander in Bezug auf die Motilitätssteigerung durch AII zeigt, dass Losartan[®] und Saralasin, nicht jedoch PD123319 den motilitätssteigernden Effekt von AII aufheben konnten (Kapitel 4.4, Abb. 46). Diese Daten weisen auf die Bedeutung des AT1 bei der Modulation der Bewegung humaner Spermatozoen hin. Währenddessen scheint der AT2, diesen Ergebnissen zufolge, nicht mit der Steuerung der Motilität humaner Spermatozoen in Beziehung zu stehen. Dies ist konkordant zu den in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnissen des Nachweises von AT1 und des erstmaligen Nachweises von AT2 auf humanen Spermatozoen (Kapitel 4.1 und 4.2). Der AT1 konnte im Bereich des Mittelstücks, dem Spermatozoenbereich, indem die Energie für die Bewegung des Flagellums bereitgestellt wird (Siehe 1. 2.) und des Flagellums selbst nachgewiesen werden. Der AT2 hingegen ließ sich im Bereich des Kopfes, einem Bereich, indem andere Funktionen, wie die Akrosomenreaktion lokalisiert sind (Müller et al., 1998), nachweisen.

Die widersprüchlichen Resultate der erwähnten Studien in dieser Arbeit lassen vermuten, dass es sich beim lokalen RAS um ein **redundantes System** handelt, dessen Ausfall kompensiert werden kann.

Schließlich kann es sich, wie im Blutkreislauf, um ein modulierendes System handeln, dessen Ausfall nicht sofort zum Stillstand der Spermatozoen führt (genauso wenig wie die Einnahme von ACE-Hemmern oder AT1-Blockern zu fehlendem Blutdruck führt). Irrelevante und nicht

verwendete Strukturen werden evolutionsbiologisch eradiziert oder zeigen sich nur noch als Rudimente oder Atavismen. Der Analogieschluss ist, dass das lokale RAS eine relevante Funktion auf humanen Spermatozoen haben muss, sonst würde es mit der Zeit aus diesem Bereich verschwinden. Weiterhin ist zu bedenken, dass einige der diskutierten Studien mit kontroversen Ergebnissen, an Tieren und eben nicht, aus ethischen Gründen, am Menschen durchgeführt werden mussten. Die Distribution des RAS ist jedoch, wie beschrieben, speziesabhängig. Beim Pferd finden sich AT1-Rezeptoren im Kopfbereich (Sabour et al., 2000) der Spermatozoen, beim Menschen sind hier AT2, nicht aber AT1 nachweisbar.

Zusätzlich müssen die vielen unbekannteten Faktoren berücksichtigt werden: Es mag durchaus unbekannte Substrate, Rezeptoren und intrazelluläre Mechanismen geben, die sogar innerhalb einer Art respektive in verschiedenen Rassen, bestimmte Enzymdefekte kompensieren. So wird beispielsweise von verschiedenen Autoren vermutet, dass im Genitaltrakt nicht die klassische Peptidkaskade (Abb. 5, S. 22) abläuft, obwohl die gleichen Bestandteile dort vorherrschen (Peterson et al., 1993, Vinson et al., 1995, Leung et al., 2003). Daher ist es möglich, dass die ursprünglichen Effekte in vitro noch induziert werden können, die Kaskade in vivo aber anders verläuft (ein Beispiel könnte AII im Seminalplasma sein, dass hier sofort abgebaut wird. Dessen Funktion könnte im Ursprungsorgan liegen, die Präsenz im Seminalplasma könnte als „Abfallprodukt“ interpretiert werden, dass durch die Enzyme des Seminalplasmas schnell „entsorgt“ wird). Erst recht könnten diese Faktoren divergierende Resultate zwischen verschiedenen Arten erklären.

Anmerkung: Kritisch muss an den Studien von Vinson et al. (1995, 1996) festgehalten werden, dass der Student-t-Test zur statistischen Auswertung der Ergebnisse eingesetzt wurde. Motilitätsparameter humaner Spermatozoen sind nicht standardnormalverteilt, der adäquate statistische Test ist somit ein nicht-parametrischer Test, z. B. ein Vorzeichenrangtest. In diesem Fall ist es der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte modifizierte Wilcoxon-Test, mit dem Hodges-Lehmann-Schätzer als adäquaten Schätzwert. Ein statistischer Unterschied ist bei fehlender Überlappung der Konfidenzintervalle vorhanden.

Das Signifikanzniveau „p“ ist die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine fälschlicherweise abgelehnte 0-Hypothese (mit einer Wahrscheinlichkeit von kleiner 5% ($p < 0,05$) ist also ein beobachteter Effekt, doch zufällig entstanden). Die meisten Studien bezüglich der Motilitätsparameter sind offensichtlich jedoch explorativ (und unter Verwendung parametrischer Tests) durchgeführt worden (Sato, 1980; Kaneko & Moriwaki, 1981; Hellström und Sikka, 1989; Hammitt et al., 1989; Miska & Schill 1990; Schill & Miska, 1992, Müller et al., 1990, 1992; Köhn et al., 1993; Airbag et al., 1994; Somlev & Helili,

1996; Vinson et al., 1996; Stanic, 2002), andernfalls würde es sich bei der Menge der oft dabei untersuchten Parameter um multiples Testen handeln. Das Angeben eines p-Wertes oder die Bezeichnung als „signifikant“ sind in explorativen Studien nicht zulässig. Weiterhin gilt das Signifikanzniveau $p < 0,05$ nicht pauschal, sondern muss vor der Studie, genauso wie der Probenumfang n , berechnet werden.

Unterschiede können in diesem Fall aufgrund des multiplen Testens mit einer, proportional der Menge der getesteten Parametern, hohen Wahrscheinlichkeit zufällig generiert worden sein.

In den Ergebnissen bei Vinson et al. (1995, 1996) wird dies beispielsweise daran deutlich, dass die Standardabweichung gelegentlich auch negative Werte annimmt (angegeben in der Publikation ist der Standardfehler ($SEM = \text{Standard-Error of the Mean}$), Umrechnung auf die Standardabweichung zeigt den negativen Wert auf), was nicht möglich ist. (Ausführliche Beratungsgespräche mit Herrn Dr. Boedecker vom Medizinisches Institut für Informatik, Justus-Liebig-Universität Gießen)

Letztlich muss festgehalten werden, dass die Ergebnisse bei Mäusen, pro und kontra einer Relevanz des RAS für den Reproduktionsvorgang, nur mit äußerster Vorsicht auf den Menschen übertragen werden dürfen und nur sehr beschränkt daraus Bedeutung für die Prozesse im humanen Organismus abgeleitet werden können.

6. Zusammenfassung

6. 1. Deutsch

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein ubiquitär im menschlichen Organismus vorhandenes Regulationssystem. Neben dem systemischen RAS, das vor allem an der Blutdruckregulation beteiligt ist, existiert ein gewebeständiges RAS, dessen Funktion für die meisten Gewebe noch nicht vollständig geklärt ist.

Das RAS setzt sich, wie in Abbildung 43, S. 131 gezeigt, zusammen aus den Enzymen Prorenin, Renin und Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE). Substrat der Kininase ACE ist Angiotensin I (AI), das durch Renin aus Angiotensinogen entsteht. ACE wandelt AI in das hochaktive Oktapeptid Angiotensin II (AII) um.

Die einzelnen Bestandteile dieser Peptidkaskade sind im männlichen und weiblichen Reproduktionstrakt nachweisbar. AII vermittelt seine Wirkung über spezifische Oberflächenrezeptoren, die als AII-Rezeptor Typ 1 (AT1) und Typ 2 (AT2) bezeichnet werden. Beide wurden unter anderem im Rattennebenhoden beschrieben. ACE führt zur Bildung von AII aus AI. Neben ACE können weitere Enzyme wie Chymase, Cathepsin G und Carboxypeptidase A im Seminalplasma identifiziert werden, die vermutlich für den raschen AI-Abbau im Seminalplasma (eigene, nicht dargestellte und noch unveröffentlichte HPLC-Ergebnisse) mitverantwortlich sind. Die Inaktivierung von AII erfolgt durch proteolytische Enzyme, die als Angiotensinasen bezeichnet werden. Es lässt sich auch eine lokale Produktion von AII in Hoden, Nebenhoden und Leydigzellen nachweisen. Das Testes-RAS wird wahrscheinlich durch Sexualhormone und Gonadotropine reguliert. Die genauen Mechanismen der Regulation auf molekularer Ebene sind jedoch weitgehend ungeklärt.

Diese Arbeit liefert den Nachweis der AII-Rezeptoren Typ 1 und 2 auf menschlichen Spermatozoen mittels Immunzytochemie und Immunoblot. Es wird weiterhin **AII im Seminalplasma** nachgewiesen und durch Untersuchungen an vasktomierten Männern die bislang noch nicht geklärte Produktionsstätte des im Seminalplasma nachweisbaren AII eingegrenzt. Schließlich wird der **Einfluss von AII auf die Motilität humaner Spermatozoen** untersucht und die Wirkung von AII-Rezeptorantagonisten auf diese Effekte getestet. Es wird zudem überprüft, ob der Effekt nach Entfernung des zugesetzten AII persistiert. Dabei wird erstmals auf eine korrekte statistische Auswertung geachtet.

AII ließ sich im Seminalplasma erstmals mittels quantitativem ELISA in einer Konzentration von 1 ng/ml nachweisen und liegt damit um den Faktor 20 über den in der Literatur

beschriebenen Werten, welche noch mittels RIA bestimmt wurden. Der Grund dafür ist vermutlich, dass AII im Seminalplasma sehr schnell abgebaut wird (eigene unveröffentlichte HPLC-Untersuchungen) was im Versuchsablauf dieser Studien nicht berücksichtigt wurde. Vasektomierte Männer weisen die gleiche AII-Konzentration im Seminalplasma auf. Dies deutet darauf hin, dass das im Ejakulat vorhandenen AII, nicht dem AII entspricht, das im Hoden nachweisbar ist.

Mittels Immunzytochemie ließen sich der **AT1** und der **AT2** auf menschlichen Spermatozoen nachweisen. AT1 ist postakrosomal, im Bereich des Flagellums und im Mittelstück lokalisiert. AT2 konnte erstmals in der akrosomalen Region nachgewiesen werden. Es gelang auch erstmalig der Nachweis beider Rezeptoren mittels Immunoblot. Diese Ergebnisse liefern das morphologische Korrelat der beobachteten Effekte von AII auf humane Spermatozoen (Induktion der AR über den AT2 und Steigerung der Motilität über den AT1).

AII beeinflusst die **Motilität** humaner Spermatozoen. Dies konnten frühere Untersuchungen nachweisen. Die statistische Auswertung für diesen nicht standardnormalverteilten Parameter erfolgte jedoch parametrisch. Weiterhin wurden die Effekte stets nur über kurze Zeiträume hinweg untersucht.

In dieser Arbeit wird erstmals auf eine korrekte statistische Auswertung geachtet und der Effekt von AII nach 15 und 60 Minuten sowie nach einem Waschschrift beobachtet. Der größte Effekt auf die Motilität humaner Spermatozoen wurde nach Inkubation mit AII in einer Konzentration von 10^{-9} M über 60 min erreicht (Abb. 31 und 32). Der Prozentsatz motiler Spermatozoen stieg unter AII um 19,5 %, während der Anteil immotiler Spermatozoen reduziert wurde (Abb. 27 und 28). Weiterhin wurden die Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP positiv beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Zwischen den zwei gebildeten Gruppen andrologische Patienten und gesunde Probanden zeigte sich prinzipiell die gleiche Tendenz nach Zugabe von AII, nämlich eine Zunahme der Motilität. Die Motilitätszunahme durch AII konnte durch das Bluthochdruckmedikament Losartan[®], einen spezifischen AT1-Antagonisten, und Saralasin, einen unspezifischen AT-Antagonisten, inhibiert werden (Abb. 35 und 42). Hingegen konnte der spezifische AT2-Antagonist PD123319 in vorangehenden Untersuchungen zwar die akrosomale Reaktion durch AII verhindern, nicht aber die durch AII induzierte Motilitätszunahme (Abb. 41). AI erhöht ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße, die Motilität humaner Spermatozoen (Daten nicht gezeigt).

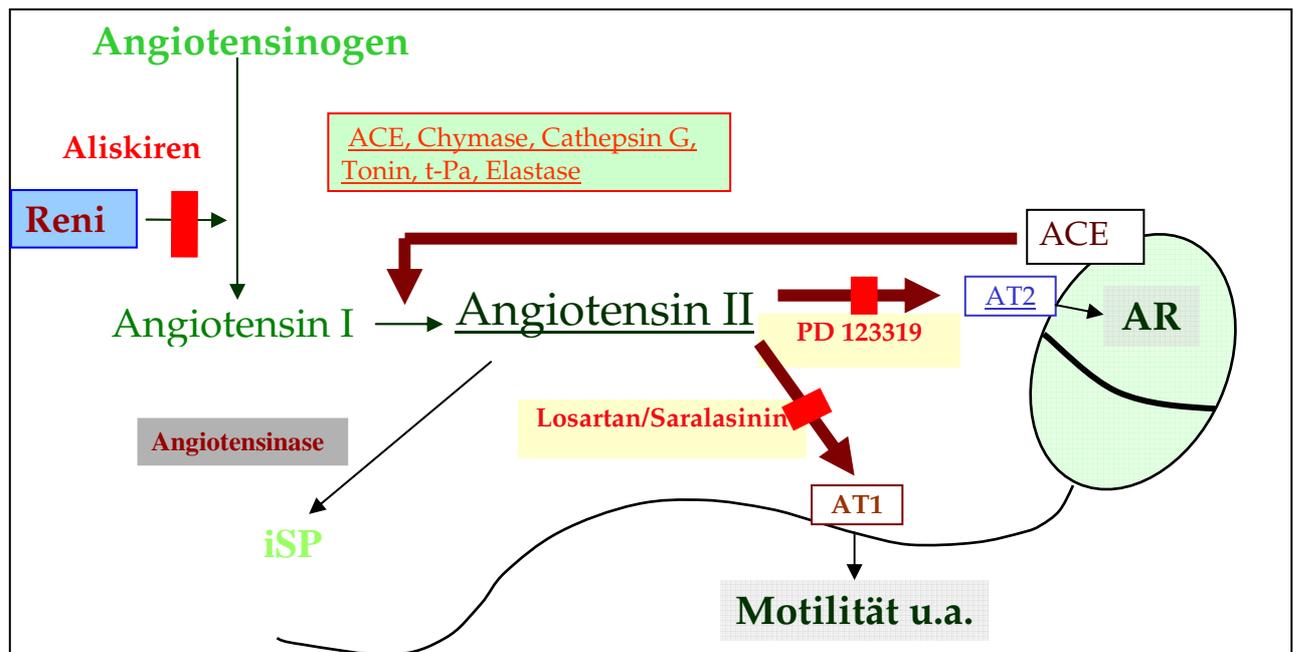


Abb. 43: Die Kininkaskade und die Angiotensinogenkaskade stehen über die Dipeptidylcarboxypeptidase ACE (=Kininase II) miteinander in Verbindung. Während ACE in der Kininkaskade für die Inaktivierung der Hormone zuständig ist, führt es in der Angiotensinogenkaskade zur Bildung des aktiven Hormons AII aus AI. Angiotensinogen, ein α_2 -Globulin, wird durch das Glycoprotein Renin in das Dekapeptid AI überführt. ACE spaltet ein Dipeptid vom carboxyterminalen Ende des AI ab, wodurch AII, das aktive Hormon der Angiotensinogen-Kaskade, entsteht. AII vermittelt seine Wirkung über die AII-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 (AT1 und AT2). Es handelt sich um Rezeptoren der „7-Transmembran-Rezeptor-Familie“. Diese befinden sich somit in der Zellmembran; die Second-messenger-Systeme sind dabei nicht immer gleich und für Spermatozoen nicht vollständig determiniert. Wie in dieser Arbeit dargestellt, ist der AT1 postakrosomal, am Mittelstück und am Flagellum humaner Spermatozoen lokalisiert (Abb. 16 und 17). Der AT2 hingegen findet sich ausschließlich im Bereich des Akrosoms (Abb. 18-20). Über den AT2 lässt sich die akrosomale Reaktion induzieren. Dieser Effekt kann durch den spezifischen AT2-Rezeptorantagonisten PD123319 aufgehoben werden. Als Second-messenger-System findet sich für diesen Rezeptor am Spermatozoenkopf eine Proteinkinase, die einen Kalziuminflux herbeiführt. Neue Medikamente wie Aliskiren hemmen Renin direkt.

Das RAS lässt sich im menschlichen Reproduktionstrakt nachweisen. Der medikamentöse Einfluss des RAS ist wesentlicher Bestandteil internistischer Bluthochdrucktherapie, die sich zunehmend auch auf junge Menschen, im reproduktionsfähigen Alter erstreckt. Die dabei beeinflussten Rezeptoren und Peptide lassen sich auf menschlichen Spermatozoen (AT1,

AT2, ACE) und im Seminalplasma (AII) nachweisen. Die Auswirkungen dieser Therapie auf die Funktion humaner Reproduktionsorgane sind weitgehend unklar, wenn auch gezeigt werden konnte, dass eine ACE-Hemmer-Therapie bei einer Schwangeren in der Embryonalperiode zu Fehlbildungen führt.

Diese Arbeit belegt durch den Nachweis der AII-Rezeptoren auf menschlichen Spermatozoen, von AII im Seminalplasma und den Effekten von AII auf humane Spermatozoen sowie den Einfluss von Rezeptorantagonisten auf diese Effekte, dass weitere Studien notwendig sind, um eventuelle Interaktionen einer internistischen Therapie mit der Reproduktion aufzudecken.

Weiterhin ergeben sich therapeutische Möglichkeiten. Die Befruchtung der Eizelle, die Erfolgsrate der IUI und der IVF korrelieren positiv mit der Geschwindigkeit und Motilität humaner Spermatozoen. Beide Faktoren können durch AII gesteigert werden. Ein Zusatz von AII vor allem in der IUI und vermutlich auch in der IVF könnte die Erfolgsrate beider Therapieverfahren erhöhen und somit mehr Menschen helfen und Kosten senken. AII ist dabei ein körpereigenes Hormon und vermittelt die beschriebenen Effekte in physiologischer Dosierung. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind daher höchst unwahrscheinlich.

6. 2. Englisch

The renin-angiotensin-system (RAS) is a widespread regulatory hormone system in the human organism. Besides the systemic RAS which mainly regulates blood pressure, there is also evidence for a local RAS with of hitherto mostly unknown function.

The RAS is formed by the enzymes prorenin, renin and angiotensin converting enzyme (ACE) and by the substrates angiotensinogen, AI and the most active octapeptide AII (*Fig. 43*).

The different components of this cascade are present in the male and female reproductive system. This includes the receptors for AII that for example were demonstrated to be present in rat testes. AII exerts its effects on various tissues by interacting with two main types of cell surface receptors classified as type 1 (AT1) and type 2 (AT2). Both subtypes were proved to be present in rat epididymis. In previous experiments AII, in contrast to AI, was shown to induce the acrosome reaction in human spermatozoa.

The testis RAS appears to be regulated by both sex hormones and gonadotropins. AII generation has been directly demonstrated in the human testis and was located in the Leydig

cells and epididymis. Comparatively little is understood about the molecular mechanisms that regulate the events in normal and pathological functions of the gonads.

Besides ACE and chymase, cathepsin G and carboxypeptidase A could be detected in human semen, possibly playing a role in AI degradation. By them and other unspecific proteolytic enzymes AI degradation occurs rapidly in human semen (own HPLC experiments, data not shown). AII is inactivated by proteolytic enzymes called angiotensinases.

The purpose of the present study was to investigate the effects of AII on human sperm motility, unlike former studies using an appropriate statistic method, the influence of different AII-receptor blockers on AII-stimulated sperm motility, localization and characterization of the two angiotensin-receptor subtypes (AT1, AT2) on human spermatozoa and measurement of the AII-concentration in human seminal plasma. By investigating AII in seminal plasma of vasectomized patients, evidence for AII production outside the testis was found.

This study proves the presence of AT1 and AT2 on human spermatozoa using different methods such as immunocytochemistry (Fig. 16 to 20) and immunoblotting (Fig 21 and 22). AII is shown to be present in human seminal plasma (Fig 23 and 24).

Furthermore, the influence of AII on human sperm motility was investigated even after a washing step to prove that AII effects remain after eliminating the substance. At least the effects of receptor blockers on the stimulatory effects of AII were investigated. For the first time a statistically appropriate method was used to evaluate the results.

For the first time **AII** was shown to be a component in human seminal plasma by ELISA. With 1ng/ml the concentration of AII was found to be 20 times higher than levels cited in the literature. The reasons remain unclear but are most likely because of the different ways of processing the samples, as AII is quickly degraded in human seminal plasma, a factor that had obviously not been considered in these studies.

Vasectomized patients show the same amount of AII as normal men, which proves that the testis cannot be the location of the production of AII found in seminal plasma.

The strongest stimulatory effect on motility was demonstrated after incubation with 10^{-9} M AII for 60 min (Fig. 31 and 32). The percentage of motile spermatozoa was significantly increased ($\Delta 19,5\%$), whereas the percentage of immotile spermatozoa was reduced (Fig. 31 and 32). There was also a significant positive influence on the velocity parameters and the linearity (data not shown). A significant difference was observed in the tendencies shown by AII on sperm motility between patients and healthy young men (data not shown). AII-

stimulated motility was markedly inhibited by the AT1-receptor-selective antagonist Losartan[®] and the nonspecific receptor blocker saralasin (Fig. 35 and 38). In contrast, the AT2-selective antagonist PD123319 showed no effect (Fig. 41). Immunocytochemistry showed **AT1-receptor** immunoreactivity in the flagellum and midpiece of non-capacitated spermatozoa (Fig. 16, 17). The **AT2-receptor** was localized only in the acrosomal region (Fig. 18-20). Furthermore AT1 and AT2 can be located on human spermatozoa by immunoblotting (Fig. 21 and 22). AII concentration in human seminal plasma is about 1 ng/ml. There is a detectable variation of seminal AII concentration in patients. Fig. 47 sums up the results of this work showing the RAS as an effective system in inducing acrosome reaction and modification of sperm motility. ACE connects to different cascades. On the one hand the kininogen cascade in which it deactivates active kinins, and on the other hand the angiotensin cascade in which it activates AII by cleaving two amino-acids from AI. AII exerts its effects on human spermatozoa by activating two different types of AII-receptors (AT), the AII receptor type 1 (AT1) and type 2 (AT2). The AT2 is found on the head of human spermatozoa. It is known that acrosome reaction is induced by AII and that this effect can be blocked by the specific AT2-antagonist PD123319 but not by AT1-antagonists. Thus, the AT2 was found by using immunocytochemistry and immunoblotting on the head of human spermatozoa, whereas the AT1 was found in the midpiece and on the tail, giving proof of the results that AII can stimulate motility and speed (data not shown) of human spermatozoa, whereas the specific AT1-antagonist Losartan[®] and the non-specific AT-antagonist Saralasin can inhibit these effects. AII could be usefully in the treatment of infertile couples. It could be added to the sperm samples used for IVF, for example to raise the percentage of motile sperm, which correlates with the success of these methods. Besides the benefits for the couples this could lower the costs of in vitro fertilization by reducing the attempts to achieve pregnancy.

RAS is found in the male reproductive system. The pharmacological intervention with this system is used in the treatment of high blood pressure. Not only elder people are treated. An increasing number of younger patients with high blood pressure have to take ACE inhibitors or AT1-antagonists. The involved receptors and enzymes are localized in the male reproductive systems, and little is known about the effects, that such a treatment has on male and female reproduction. Nevertheless, the treatment of pregnant women with ACE inhibitors caused embryopathy, which demonstrates the severe effects that such a treatment can have on human reproduction. Therefore, further studies are necessary to investigate the effects of these drugs on male and female reproduction.

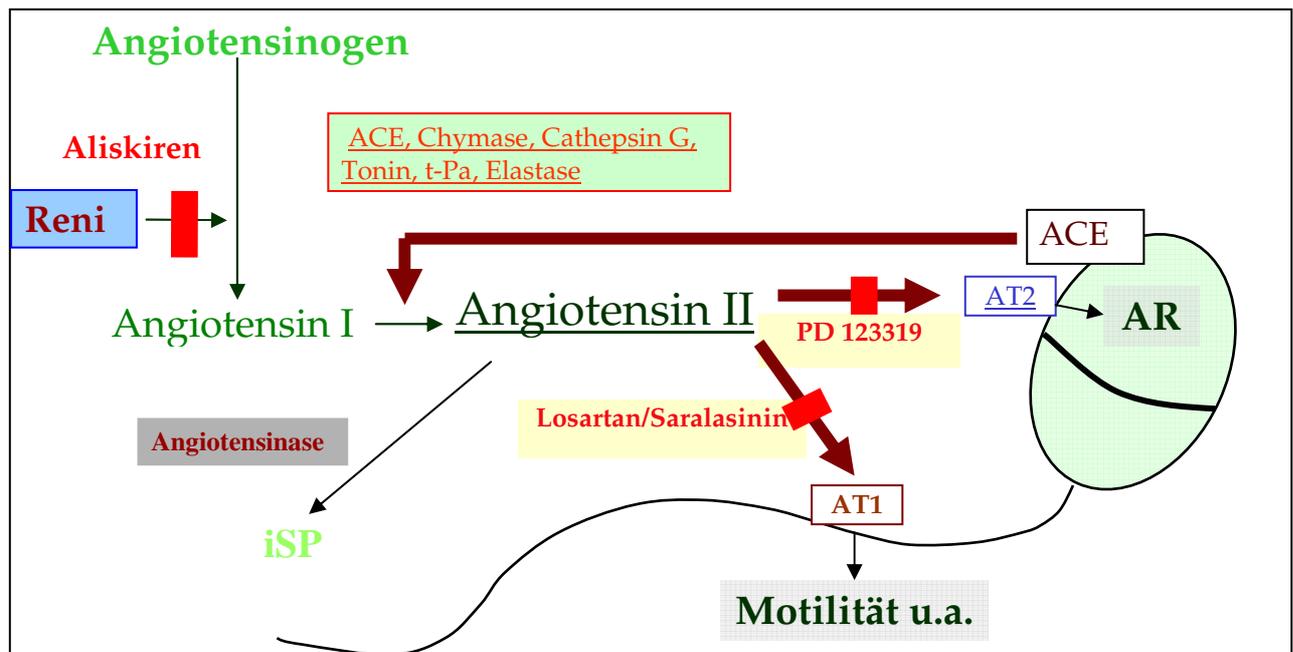


Abb. 43: The kinin cascade and the angiotensinogen cascade are connected through the dipeptidylcarboxypeptidase ACE (=kininase II). While ACE is responsible for inactivation of the hormones in the kinin cascade, it activates AII in the angiotensinogen cascade. Angiotensinogen is an α_2 -globulin which is transformed into the decapeptide AI by the glycoprotein renin. ACE cleaves a dipeptide from the carboxyterminal end of AI, which leads to the most active hormone AII. AII exerts its effects through specialized AII-receptores Type 1 and Type 2 (AT1 and AT2). They are members of the „7-transmembral-receptore-family“. Thus they are located on the cell surface; the second-messenger-systems are not always identical and still undetermined in spermatozoa. As shown in this study, the AT1 is found in the postacrosomal region, midpiece and flagellum of human spermatozoa (Fig. 16 and 17). The AT2 however, is only found in the acrosomal region (Abb. 18-20). Via AT2, acrosomal reaction can be induced. This effect can be blocked by the specific AT2-rezeptor antagonist PD123319. There is evidence for a protein kinase as second messenger, which leads to a Ca^{2+} -influx. New drugs like Aliskiren are able to inhibit Renin directly.

In addition, there is a therapeutic indication for the use of AII in the methods of assisted reproduction like IUI and IVF. The motility of human spermatozoa is correlated with the fertilization rate in the methods of assisted reproduction. AII could be applied without the fear of side effects, when used at the physiological concentration showing the highest effects. Thus, more infertile couples could be helped and the costs for the treatment could be lowered.

7. Herstellerliste und eingesetzte Materialien

Alle Substanzen erfüllten die Kriterien „biochemisch rein“, „cell-cultere-tested“ oder „first quality“.

| Hersteller | Produkt |
|---|--|
| Amersham Pharmacia Biotech UK Amersham Place, Little Chalfont Buckinghamshire England | ECL TM RPN 2106 OL/98/08, Batch 112 |
| Bandelin electronic GmbH & Co. KG Heinrichstraße 3-4, D-12207 Berlin | Bandelin Sonopuls HD60 Ultraschall-Homogenisator |
| Bechthold GmbH Röntgenhandel Fischbacher Straße 6, 65779 Kelkheim | Fuji RX New, 18 x 24cm |
| Carl Roth GmbH & Co. KG Schoemperlenstraße 3, 76185 Karlsruhe | Rotiblock A151.1 Ponceau S für Histologie Art. Nr.: 5938,1 |
| Chiron-Behring GmbH & Co, Marburg Postfach 1630 | Humanalbumin, LotNo. / Ch.-B. 455076A |
| Dianova Gesellschaft für biochemische, immunologische und mikrobiologische Diagnostik GmbH Warburgstr. 45, D-20354 Hamburg | Mouse-anti-rabbit B (Spacer) Strept Cy3 Biotin-SP-conjugated AffiniPure Rabbit Anti Mouse IgG 315-065; Lot 27810 |
| Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG Saarbrückener Straße 248 D-38116 Braunschweig | SuperFrost Plus Objektträger 25x75x10mm |
| Immunotech, a Beckman Coulter Company, 130, av. de Lattre de Tassigny – BP 177 – 13276 Marseille Cedex 09, France | PAP-Pen |
| Mallinckrodt Baker, European Headquarters: Mallinckrodt Baker B.V. Teugseweg 20, P.O. Box 1, 7400 AA, Deventer, The Netherlands | Acetonitril (9017) |
| Mello Ltd D-35753 Greifenstein | Glaswollfilter Sperm-Fertil |
| Millipore GmbH AmKronberger Hang 5 65824 Schwalbach Deutschland | Millipore Immobilon NC Pure Sterivex-GV-Filter SVG-01015 |
| Merck & Co., Inc. P.O.Box 2000 Rahway New York 07065, USA | Losartan CaCl ₂ x 2H ₂ O 2382, Glukose (wasserfrei) |

| | |
|--|--|
| | 8337, KCl 4933, KH ₂ PO ₄ 4873 MgSO ₄ x 7, H ₂ O 5886, NaHCO ₃ 63329, Phenolrot 7241 TBS |
| Oxoid Limited Wade Road, Basingstoke Hampshire RG24 8PW, England | Phosphate Buffered Salina, Code BR14a, Lot 94824-001 |
| Santa Cruz Biotechnology, Inc. Ludolf-Krehl-Straße 33 69120 Heidelberg (Ger) | sc1173AT1 N10; sc2048: Luminol sc 2350: Bov.agoat IgG HRP sc7419 Angiotensin I/2 (N10) sc2357 mouse anti rabbit IgG HRP sc7419 Angiotensin I/2 (N10) Peptide sc-2035 Cruz Marker MW Standards 132kDa, 90 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 23 kDa sc-2361 prestained MW Standards 97, 66, 44, 29, 17, 14; sc-2214 KNRK Whole Cell Lysate sc579 AT1 (306) |
| Serva Electrophoresis GmbH Carl-Benz-Straße 7 69115 Heidelberg Serva Feinbiochemica GmbH. & Co 6900 Heidelberg | Glycidether Art. Nr. 21045, Lot 11942 Cacodylsäure*Na-Salz*3H ₂ O rein Art. Nr. 15540, Lot 12086, Na-Pyruvat 15220 Propylenoxid 33715, 11357 |
| Sigma Aldrich Chemie GmbH Kappelweg 1 91625 Schnelldorf | Angiotensin I, human, synthetisch, Prod. Numb.: 10382-5MG, Lot 0100283706 Angiotensin II, human synthetisch, Prod. Numb.: 10383-1MG 981130 u. 990211, Penizillin-G P-3032, DMSO, (Dimethylsulfoxid), DAPI (4, 6-Diamidino-2-phenylindol-2HCL), HSA (Humanes- Serum-Albumin), Fraction V powder, Saralasin, PD 123, 319, FITC-PSA |
| Titertek Labsystems, 330 Wynn Drive Huntsville, Alabama 35805 | <i>Photometer Multiscan MCC/340,</i> |

8. Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1990): Molekularbiologie der Zelle. 2. Auflage, VCH-Verlag, Weinheim, Basel, Cambridge, New York.

Amit A., Bergman A., Yedwab G., David M.P., Homonnai T.Z., Paz G. (1982): Human sperm penetration into cervical mucus in vitro: correlation between its quality, penetration capacity and velocity. Gynecol Obstet Invest.;14:283.

Andrade J.R., Traboulsi A., Hussain A., Dubin N.H. (2000).: In vitro effects of sildenafil and phentolamine, drugs used for erectile dysfunction, on human sperm motility. Am J Obstet Gynecol. May;182:1093.

Angeli, Wilhelm, Die Venus von Willendorf, Edition Wien Verlag Wien 1989.

Arnoult, C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R. et al. (1996): Activation of mouse 1080–1087. sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. Proc. Natl Acad. Sci. USA , 93, 13004

Austin, C.R. (1951): Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci.Res. April, 4-581

Austin C.R. (1952): The ‘capacitation’ of the mammalian sperm. Nature; 170: 326

Austin, C.R. (1960): Capacitation and release of hyaluronidase from spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 1, 310

Austin, C.R. (1975): Membran fusion events in fertilization. J. Reprod. Fertil. 44, 155

Austin C.R. (1985): Sperm maturation in the male and female genital tracts. In: Metz CB, Monroy A (eds.), Biology of fertilization. Fla: Academic press Inc.,2, Orlando, pp. 121

Austin, C.R., Bishop, M.W.H. (1958): Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 149, 241

Barlow P, Delvigne A, Dromme J van, Hoeck J van, Vendenbosch K., Leroy F. (1991): Predictive value of classical and automated sperm analysis for in-vitro fertilization, *Human Reproduction*; June: 1119

Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E., Austin, C.R. (1967): Membrane vesiculation as a feature of mammalian acrosome reaction. *J. Cell. Biol.* 34, C1-C5.

Berg T., Sulner J., Lai C.Y., Soffer R.L. (1986): Immunohistochemical localization of two angiotensin I-converting isoenzymes in the reproductive tract of the male rabbit. *J Histochem Cytochem.* 1986 Jun;34:753.

Blackmore, P.F., Beebe, S.I., Danforth, D.R., Alexander, N. (1990): Progesteron and 17 β -Hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.* 265, 1376.

Bleil, J.D., Wassarman, P.M. (1983): Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95, 317.

Bollendorf A., Check J.H., Lurie D. (1996): Evaluation of the effect of the absence of sperm with rapid and linear progressive motility on subsequent pregnancy rates following intrauterine insemination or in vitro fertilization, *Journal of Andrology*, 17: 550.

Brentjens J.R., Matsuo S., Andres G.A., Caldwell P.R., Zamboni L. (1986): Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). *Experientia.* Apr 15;42:399.

Brown, C.R., Harrison, R.A. (1978): The activation of proacrosin in spermatozoa from ram bull and boar. *Biochem. Biophys. Acta* 526, 202.

Brucker, C., Lipford, G.B. (1995): The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum. Reprod. Update.* 1, 51.

Bruckert, E. (1991): How frequent is unintentional childlessness in Germany? *Andrologia* 23, 245.

Buch, J.P. (1993): Advance sperm function testing. *Curr. Opin. Urol.* 3, 503.

Burkman, L.J. (1990): *Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. In: Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects (Gagnon C. ed.), CrC Press Boca Raton; pp 303.*

Chan H.C., Wong P.Y. (1996): *Paracrine/autocrine regulation of anion secretion in the epididymis: role of angiotensin II. Biol Signals. Nov-Dec: 309.*

Chang, M.C. (1984): *The meaning of sperm capacitation. J. Androl. 5, 45.*

Chao H.T., Ng H.T., Tsai K.L., Hong C.Y., Wei Y.H. (1992): *Human follicular fluid stimulates motility and velocity of washed human sperm in vitro. Andrologia. Jan-Feb;24:47.*

Check JH, Adelson HG, Bollendorf A.(1991): *Effect of antisperm antibodies on computerized semen analysis. Arch Androl. Jul-Aug;27:61.*

Cohn, J. N., Johnson, G., Ziesche, S., Cobb, F., Francis, G., Tristani, F., Smith, R., Dunkman, B., Loeb, H., Wong, M., Bhat, G., Goldman, S., Flechter, R. D., Doherty, J., Hughes, V.,

Carson, P., Cintron, G., Shabetai, R. and Haakenson, C. A, (1991).: *comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. N Engl J Med., 325:303.*

Cooper, T.G. (1986): *The epididymis, Sperm maturation and Fertilisation. Springer Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo*

Corselli, J., Talbot, P. (1987): *In vitro penetration of hamster oocyte-cumulus complexes using physiological numbers of sperm. Dev. Biol. 122, 227.*

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., Hanson, F.W. (1988): *Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. Bio. Reprod. 38, 235.*

Croxatto, H-B, Oritz M-E, Diaz, S, Hess, R, Balmaceda, J, Croxatto H-D (1978): *Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following the luteinizing hormon peak. Am. J. Obstst. Gynecol., 132, 629.*

Davis R.O., Katz D.F. (1993): *Operational standards for CASA instruments. J Androl. Sep-Oct;14:385.*

Davis R.O., Katz D.F. (1992): Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl.* Jan-Feb;13:81-6.

Davis R.O., Katz D.F. (1989): Computer-aided sperm analysis (CASA): image digitization and processing. *Biomater Artif Cells Artif Organs.* 17:93.

De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J.W. & Unger, T.H. (2000): Angiotensin II receptors. *Pharmacological Reviews,* 52: 415.

DeJonge, C.J., Han, H.L., Lawrie, H., Mack, S., Zaneveld, L.J.D. (1991a): Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J. Exp. Zool.* 258, 113.

DeJonge, C.J., Mack, S.R., Zaneveld, L.J.D. (1989): Inhibition of the human sperm acrosome reaction by proteinase inhibitors. *Gamete Res.* 23, 387.

de Lamirande E., Leclerc P., Gagnon C. (1997): Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 175.

Delgado, N.M., Reyes, R., Mora-Galindo, J., Rosado, A. (1988): Size-uniform heparin fragments as nuclear decondensation and acrosome reaction inducers in human spermatozoa. *Life Sci.* 42, 2177.

Dinh, D. T., Frauman, A. G. , Casley, D. J., Johnston C. I. , Fabiani M. E., (2001b): Angiotensin AT(4) receptors in the normal human prostate and benign prostatic hyperplasia. *Molecular and Cellular Endocrinology,* 184: 187.

Dobrinski I., Ignatz G.G., Fagnan M.S., Yudin S.I., Ball B.A. (1997): Isolation and characterization of a protein with homology to angiotensin converting enzyme from the periacrosomal plasma membrane of equine spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* Oct; 48:251.

Edwards R. G., Steptoe P. C., Purdy J. M., (1980): Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol.* Sep;87:737.

Edwards Robert, Steptoe Patrick, *A Matter of Life* (1980): *The Story of a Medical Breakthrough*. New York , S. 113.

Edwards IS. (1981): *Sperm motility*. *Fertil Steril*. Apr;35:484.

Esther C.R., Howard T.E., Marino E.M., Goddard J.M., Capecchi M.R., Bernstein K.E. (1996): *Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility*. *Lab Invest*. 1996 May;74:953.

Florman, H.M., Corron, M.E., Kim, T.D.H. et al. (1992): *Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis*. *Dev. Biol*. 152, 304.

Fock-Nüzel, R., Lottspeich, F., Henschen, A., Müller-Esterl, W. (1984): *Boar acrosin is a two-chain molecule. Isolation and primary structure of the light chain; homology with the pro-part of other serine proteinases*. *Eur. J. Biochem*. 141, 446.

Foresta C., Indino M., Manoni F., Scandellari C. (1987): *Angiotensin-converting enzyme content of human spermatozoa and its release during capacitation*. *Fertil Steril*. Jun;47:1000.

Foresta C., Mioni R, Rossato M, Varotto A, Zorzi M (1991): *Evidence for the involvement of sperm angiotensin converting enzyme in fertilization*. *Int J Androl*. Oct;14:333.

Foresta, C., Rossatao, M., and Di Virgilio, F. (1993): *Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane*. *Biochem. J.* , 294, 279.

Foresta C., Rossata M, Ferlin A, Garolla A. (1998): *Semen quality and fertility*. *Lancet*. Dec 5;352:1861.

Fraser, L.R. (1998): *Sperm capacitation and acrosome reaction*. *Hum.Reprod*. 13 (Suppl. 1),9.

Fraser L.R., Pondel MD, Vinson GP (2001): *Calcitonin, angiotensin II and FPP significantly modulate mouse sperm function*. *Mol Hum Reprod*. 2001 Mar;7: 245.

Fraser L.R., Osiguwa O.O. (2004): Human sperm responses to calcitonin, angiotensin II and FPP in prepared semen samples from normal donors and infertility patients. *Human Reprod* ; 19: 596.

Fraser L.R., Osiguwa O.O., Baxendale R. W., Mededovic S., Osiguwa O. O. (2005): First Messenger Regulation of Mammalian Sperm Function via Adenylyl Cyclase/cAMP. *Journal of Reproduction and Development*;, Vol. 51, No. 1: 37.

Gatti J.L., Druart X., Guerin Y., Dacheux F., Dacheux J.L. (1999): A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biol Reprod. Apr*;60:937.

Green, D.P. (1978): The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J. Cell Sci.* 32,137.

Grove K.L., Speth R.C. (1989): Rat epididymis contains functional angiotensin II receptors. *Endocrinology. Jul*;125:223.

Grove K.L., Speth R.C., Senger P.L. (1997): Angiotensin II as a semen extender component increases retention of spermatozoa within the uterus of the heifer. *Reprod Fertil Dev.*;9:545.

Grunert J. H., de Geyter C., Bordt J., Schneider H. P., Nieschlag E., (1989): Does computerized image analysis of sperm movement enhance the predictive value of semen analysis for in-vitro fertilization results? *Int J Androl. Oct*; 12:329.

Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *ESHRE Andrology Special Interest Group (1998). European Society for Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod. Jan*;13:142.

Gur Y., Breitbart H., Lax Y., Rubinstein S., Zamir N. (1998): Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am J Physiol. Jul*;275 Pt:E87.

Habenicht, U.-F. (1987): Akrosin - ein bedeutendes Enzym für die Fertilisation. *Fertilität* 3, 7

Hagaman J. R., Moyer J. S., Bachman E. S., Sibony M., Magyar P.L., Welch J. E., Smithies O., Kregel J.H., O'Brien D.A. (1998): Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 3;95:2552.

Handrow, R.R., Lenz, R.W., Ax, R.L. (1982): Structural comparison among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1326.

Harrison, R.A.P., Fléchon, J.-E., Brown, C.R. (1982): The localization of acrosin and proacrosin in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 66, 349.

Hedrick, J.L., Urch, U.A., Hardy, D.M. (1988): The structure-function properties of the sperm enzyme acrosin. In: Shoemaker, S., Sonnet, P., Whitaker, J. (eds.) *Enzymes in Agricultural Biotechnology*, Washington, D.C.: ACS Books, pp. 55.

Henkel R., Müller C., Miska W., Schill W.B. (1993): Determination of the acrosome reaction is predictive of fertilization in vitro. *Human Reprod.* 8: 2138.

Henkel, R., Stalf, T., Miska, W. (1992): Isolation and partial characterization of the outer dense fiber proteins from human spermatozoa. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 685.

Hinrichsen-Kohanen A.C., Hinrichsen M.J., Schill W.B. (1984): Molecular events leading to fertilization. A review. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)* 42, 51-67.

Hinting A., Comhaire F., Schoonjans B.S., (1988): Capacity of objectively assessed sperm motility characteristics in differentiating between semen of fertile and subfertile men, *Fertility & Sterility*, 50: 635.

Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I, (2001): Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *Assist Reprod Genet.* Apr;18:213.

Hohlbrugger G, Pschorr J, Dahlheim H. (1984): Angiotensin I converting enzyme in the ejaculate of fertile and infertile men. *Fertil Steril.* Feb;41:324.

Hohlbrugger G., Schweisfurth H., Dahlheim H. (1982): Angiotensin I converting enzyme in rat testis, epididymis and vas deferens under different conditions. *J Reprod Fertil.* May;65:97.

Holt W.V., Moore H.D.M., Hillier S.G. (1985): Computer assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays, *Fertility & Sterility.* 44: 112.

Howard T., Balogh R., Overbeek P., Bernstein K. E. (1993): Sperm-specific expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) is mediated by a 91-base-pair promoter containing a CRE-like element. *Mol Cell Biol.* 1993 Jan;13:18.

Hsueh WA (1988): Renin in the female reproductive system. *Cardiovasc Drugs Ther.* Nov;2(4):473.

Jackson B., Cubela, R., Sakaguchi, K., Johnston, C. L., (1987): Pharmacokinetics of angiotensin converting enzyme inhibition in tissues following oral lisinopril: studies in the rat using quantitative radioinhibitor binding. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 14: 343.

Jaiswal A. K., Panda J. N., Kumar M. V., Joshi P., (1985): Androgen dependence of testicular and epididymal angiotensin converting enzyme. *Andrologia.* Jan-Feb;17:92.

Jaiswal, B.S., Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspar, I., Eisenbach, M. (1998): Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Lett.* 427, 309.

Jamil, K., White, G. (1981): Induction of the acrosome reaction with ionophore A23187 and calcium. *Arch. Androl.* 7, 283.

Jarry H., Meyer B., Holzapfel G., Hinney B., Kuhn W., Wuttke W. (1988): Angiotensin II/III and substance P in human follicular fluid obtained during IVF: relation of the peptide content with follicular size. *Acta Endocrinol (Copenh).* Oct;119:277.

Jentzsch K. D., Hilse H., Siems W. E., Heder G. (1989): Possible involvement of the renin-angiotensin system in reproduction. II. Occurrence and role in the female reproductive tract. Zentralbl Gynakol. 111(8):485.

Johnston, C. I., Mendelsohn, F. A., Cubela, R. B., Jackson, B., Kohzuki, M., Fabris, B. (1988): Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) in plasma tissues: studies ex vivo after administration of ACE inhibitors. Journal of Hypertension. 6 (Suppl.) 17

Jones, R., Brown, C.R., Lancaster, R.T. (1988): Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. Development 102, 781.

Jones, R. (1991): Interaction of zona pellucida, sulphated carbohydrates and synthetic polymeres with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. Development 111, 1155.

Katz, D.F., Davis, R.O., Drobnis, E.Z., Overstreet, J.W. (1993): Sperm motility measurement and hyperactivation. Semin. Reprod. Endocrinol. 11, 27.

Kaneko S., Moriwaki C. (1981): Effects of kinins and dipeptidyl carboxypeptidase on the motility of highly washed human sperm. J Pharmacobiodyn. Jun;4:443.

Kaneko, S., Moriwaki, C. (1981): Studies on acrosin. I. Purification and characterization of boar arosin. J. Pharmacobiodyn. 4, 20.

Kaneko S., Oshio S., Kobayashi T., Iizuka R. (1984): Effects of angiotensins of the motility of human sperm. J Pharmacobiodyn. Feb;7:87.

Kessler S. P., Rowe T. M., Gomos J. B., Kessler P. M., Sen G. C. (2000): Physiological non-equivalence of the two isoforms of angiotensin-converting enzyme. J Biol Chem. Aug 25;275:26259.

Klemm, U., Müller-Esterl, W., Engel, W. (1991): Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. Hum. Genet. 87, 635.

Knox, F. G., Granger, J. P. (1987): Control of sodium excretion: the kidney produces under pressure. News Physiol. Sci. 2, 26.

Köhn F. M., Dammshäuser I., Neukamm C., Renneberg H., Siems W.E., Schill W.B., Aumüller G. (1998): Ultrastructural localization of angiotensin-converting enzyme in ejaculated human spermatozoa. Hum Reprod. Mar;13:604.

Köhn F.M., Miska W., Schill W.B. (1995): Release of angiotensin-converting enzyme (ACE) from human spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. J Androl. May-Jun;16:259.

Köhn, F. M., Mack, S. R., Schill, W. B., Zaneveld, J. L. (1997): Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, Pisum sativum agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. Human Reproduction, Vol 12, 714

Köhn F. M., Müller C., Drescher D., Neukamm C., Mulla K. F., Henkel R., Hagele W., Hinsch E., Habenicht U.F., Schill W. B. (1998): Effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions. Andrologia. Aug-Sep;30:207.

Krassnigg F., Niederhäuser H., Placzek R., Frick J., Schill W. B. (1986): Investigations on the functional role of angiotensin converting enzyme (ACE) in human seminal plasma. Adv Exp Med Biol. 198 Pt A:477.

Krause W. (1995): The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. Int J Androl. Dec;18 Suppl 2:32.

Krause W. (1995): Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. Hum Reprod. Oct;10 Suppl 1:60.

Krause W, Viethen G. (1999): Quality assessment of computer-assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. Andrologia. May;31:125.

Krege J.H., John S.W., Langenbach L.L., Hodgin J.B., Hagaman J.R., Bachman E.S., Jennette J.C., O'Brien D.A., Smithies O. (1995): Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature*. May 11;375:146.

Kremling, H., Keime, S., Wilhelm, K., Adham, I.M., Hameister, H., Engel, W. (1991): Mouse proacrosin gene: nucleotide sequence, diploid expression, and chromosomal localization. *Genomics* 11, 828.

Laemmli U.K., (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Aug 15;227:680.

Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Bouraima H., Bourguiba, S., Chocat, A., Carreau, S., (2003): Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. *Molecular Human Reproduction*. Vol.9, No.3 pp. 117

Langlais J., Roberts, D. (1985): A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12, 183.

Langford K. G., Zhou Y., Russell L. D., Wilcox J. N., Bernstein K. E. (1993): Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod.* Jun;48:1210.

Larsen L., Scheike T., Jensen T. K., Bonde J. P., Ernst E., Hjollund N. H., Zhou Y., Skakkebaek N.E., Giwercman A. (2000): Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod.* Jul;15:1562.

Leung P. S., Wong T. P., Sernia C., (1999): Angiotensinogen expression by rat epididymis: evidence for an intrinsic, angiotensin-generating system. *Mol Cell Endocrinol.* Sep 10;155:115.

Leung P. S., Wong T. P., Lam S. Y., Chan H. C., Wong P. Y. (2000): Testicular hormonal regulation of the renin-angiotensin system in the rat epididymis. *Life Sci.* Feb 25;66:1317.

Leung P. S., Sernia C., (2003): *The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones. Mol Endocrinol. Jun;30:263.*

Lewis S. E., Moohan J. M., Thompson W. (1993): *Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. Fertil Steril. Feb;59:418.*

Liu, D. Y., Baker, H. W. G. (1993): *Inhibition of acrosin activity with a Trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. Biol. Reprod. 48, 340.*

Liu, D. Y. & Baker, H. W. G. (2000): *Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in vitro fertilization. Hum. Reprod. 15: 702.*

Llanos, M., Vigil, P., Franken, D. R., Kaskar, K., Kruger, T. K., (1994): *Inhibition of the acrosome reaction by trypsin inhibitors and prevention of penetration of spermatozoa through the human zona pellucida. J. Reprod. Fertil. 97, 173.*

Mahi, C., Yanagimachi, R. (1973): *The effects of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. J. Reprod. Fert. 35, 55.*

Makler A. (1980): *Use of a microcomputer in combination with the multiple exposure photography technique for human sperm motility determination. J Urol. Sep;124:372.*

Makler A. (1980): *Use of the elaborated multiple exposure photography (MEP) method in routine sperm motility analyses and for research purposes. Fertil Steril. Feb;33(2):160.*

Makler A., Blumenfeld Z. (1980): *Optimum measurement time for human sperm velocity determination. Arch Androl. Sep;5:189.*

Makler A., Jakobi P. (1981): *Effects of shaking and centrifugation on human sperm motility. Arch Androl. Aug;7:21.*

Makler A., Jakobi P. (1981): *Factors affecting sperm motility. V. Washing and resuspension of human spermatozoa in various artificial media. Fertil Steril. Apr;35:442.*

Makler A., David R., Blumenfeld Z., Better O.S. (1981): Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertil Steril. Oct*;36:507.

Marushige, Y., Marushige, K. (1978): Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: an in vitro study. *Biochem. Biophys. Acta* 519, 1.

Mededovic S., Fraser L. R. (2004): Angiotensin II stimulates cAMP production and protein tyrosine phosphorylation in mouse spermatozoa. *Reproduction*. 127: 601.

Meizel, S. (1978): The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical approach. In: *Developments in mammals, vol.3*, Johnson, M.H. (eds.), North Holland, Amsterdam; pp. 1.

Meizel, S. (1985): Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with mammalian sperm surface. *Am. J. Anat.* 174, 285.

Meizel, S., Working, P.K. (1980): Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reaction by catecholamines in vitro. *Biol. Reprod.* 22, 211.

Menkveld, R., Franken, D.R., Kruger, T.F., Oehninger, S., Hodgen, G.D. (1991): Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Molec. Reprod. Develop.* 30, 346.

Miska W., Schill WB. (1990): Enhancement of sperm motility by bradykinin and kinin analogs. *Arch Androl.* 25(1):63.

Miska W., Schill W.B. (1994): Influence of bradykinin antagonists on the motility of human spermatozoa enhanced by bradykinin. *Arch Androl. Jul-Aug*;33:1.

Miska, W., Fehl, P., Henkel, R. (1994): Biochemical and immunological characterization of the acrosome reaction-inducing substance of human follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 125.

Moore, A., Penfold, L.M., Johnson, J.L., Latchman, D.S., Moore, H.D.M. (1993): Human sperm-egg binding is inhibited by peptides corresponding to the core region of an acrosomal serine protease inhibitor. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 280.

Morales, P., Llanos, M., Gutierrez, G., Kohen, P., Vigil, P., Vantman, D. (1992): The acrosome-inducing activity of individual hFF samples is highly variable and is related to the steroid content. *Hum. Reprod.* 7, 646.

Mortimer, D., Camenzind, A.R. (1989): The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Hum. Reprod.* 4, 169.

Mortimer D., Aitken R.J., Mortimer S.T., Pacey A.A. (1995): Workshop report: clinical CASA--the quest for consensus. *Reprod Fertil Dev.* 7(4):951.

Mukerjee, A.B., Lippes, J. (1972): Effect of human follicular and tubular fluids on human, mouse and rat spermatozoa in vitro. *Can. J. Genet. Cytol.* 14, 167.

Mukhopadhyay A.K., Cobilanschi J., Schulze W., Brunswig-Spickenheier B., Leidenberger F.A. (1995): Human seminal fluid contains significant quantities of prorenin: its correlation with the sperm density. *Mol Cell Endocrinol.* Apr 1;109:219.

Müller K., Heder G., Nehring H., Siems W.E., Wolf R. (1991): Investigations on the influence of bradykinin upon the motility of ram spermatozoa. *Andrologia.* Sep-Oct;23:357.

Naruse, M., Naruse, K., Shizume, K. Et al. (1984): Gonadotropin-dependent renin in rat testes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 177, 337.

Nassis, L., Frauman, A. G., Ohishi, M., Zhuo, J., Casley, D. J., Johnston, C. I., Fabiani, M. E., (2001): Localisation of angiotensin-converting enzyme in the human prostate: pathological expression in benign prostatic hyperplasia. *Journal of Pathology* 195: 571.

Nuzzo, N.A., Anderson, R.A., Jr., Zaneveld, L.J.D. (1990): Proacrosin activation and acrosin release during the guinea pig acrosome reaction. *Molec. Reprod. Develop.* 25, 52.

O'Mahony O.A., Djahanbakhch O., Mahmood T., Puddefoot J.R., Vinson G.P. (2000): Angiotensin II in human seminal fluid. *Hum Reprod. Jun*;15:1345.

O'Mahony O.A., Barker, S., Puddefoot J.R., Vinson G.P. (2005): Synthesis and secretion of angiotensin II by the prostate gland in vitro. *Endocrinology. 2005 Jan*;146, 392; Epub 2004 Sep 24

Oehninger S., Franken D.R., Sayed E., Barroso G., Kolm P.(2000): Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum Reprod Update. Mar-Apr*;6:160.

Okuyama, A., Nonomura, N., Koh, E. (1988a): Induction of renin angiotensin system in human testis in vivo. *Arch. Androl. 21*, 29.

Oliphant, G., Reynolds A.B., Thomas T.S. (1985): Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat. 174*, 269.

Olson, G.E., Hamilton, D.W. (1978): Characterization of the surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat. 174*, 269.

Osman, R.A., Andris, M.L., Jones, A.D., Meizel, S. (1989): Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.160*, 828.

Peterson, C. M., Zhu, C., Mukaida, T., Buder, T. A., Woessner, J. F., Lemaire, W. J., (1993a): The angiotensin II antagonist Saralasin inhibits ovulation in the perfused rat ovary. *American Journal of Obstetrics and Gynecology. 168*: 242.

Pitt B, Poole-Wilson P, Segal R et al. (1999): Effects of Losartan® versus captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure; rationale, design, and baseline characteristics of patients in the Losartan® heart failure survival study – ELITE II. *J Cardiac Failure. 5*: 146.

Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ Jr, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al. (1992): Effect of captopril on mortality and morbidity in

patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. N Engl J Med. Sep 3; 327:669.

Placzek R., Krassnigg F., Schill W.B. (1988): Effect of ace-inhibitors, calmodulin antagonists, acetylcholine receptor blocking, and alpha receptor blocking agents on motility of human sperm. Arch Androl. 21:1.

Polakoski, K.L.K., Siegel, M.S. (1986): The Proacrosin-Acrosin System. In: Paulson, J.D., Negro-Vilar, A., Lucena, E., Martini, L. (eds.), Andrology, Male Fertility and Sterility. Academic Press, Orlando, FL; pp. 359.

Ramaraj P., Kessler S.P., Colmenares C., Sen G.C. (1998): Selective restoration of male fertility in mice lacking angiotensin-converting enzymes by sperm-specific expression of the testicular isozyme. J Clin Invest. Jul 15;102:371.

Ratnasooriya W.D., Jayawardena K.G., Wadsworth R.M. (1990): Effects of enalapril on human sperm motility. Contraception. Feb;41:213.

Ravnik, S.E., Albers, J.J., Müller, C.H. (1993): A novel view of albumin-supported sperm capacitation: role of lipid transfer protein-1. Fertil. Steril. 59, 629.

Reid, I. A., Morris, B. J. & Ganong, W. F., (1978): The renin–angiotensin system. Annual Review of Physiology. 40 377.

Rennie D, Eisen V, Slater JD, Abdalla HI. (1988): Ovarian renin-angiotensin system. Am J Obstet Gynecol. Dec;159(6):1601

Robertson, L., Wolf, D.P., Tash, J.S. (1988): Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. Biol. Reprod. 39, 797.

Rochwerger, L., Cohen, D.J., Cuasnicu, P.S. (1992): Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. Dev. Biol. 153, 83.

Rogers, B.J., Bentwood, B.J. (1982): Capacitation, acrosome reaction and fertilization. In: Zaneveld, L.J.D., Chatterton, R.T. (eds.), *Biochemistry of Mammalian Reproduction*, John Wiley, New York; p. 203.

Sabeur K., Vo A.T., Ball B.A. (2000): Effects of angiotensin II on the acrosome reaction in equine spermatozoa. *J Reprod Fertil. Sep*;120:135.

Sabolic, I., Brown, D. (1995): Water channels in renal and nonrenal tissues. *News in Physiol. Sci.* 19 1995, 12-17. *Methods Find Exp Clin Pharmacol. Apr*;22:15.

Sacaguchi, K., Chai, S. Y., Jackson, B., Johnston, C. I., Mendelsohn, F. A., (1988): Inhibition of tissue angiotensin converting enzyme. Quantitation by autoradiography. *Hypertension. 11*: 230.

Sánchez, R., Töpfer-Petersen, E. , Aitken, R. J., Schill, W. B. (1991): A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. *Andrologia* 23,197.

Sathanathan, A.H., Trounson, A.O. (1982): Ultrastructure of cortical granulae release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. *Gamete Res.* 6, 225.

Sato H., (1980): Studies on the components of kallikrein-kinin system and treatment of male infertility. *Keio J Med. Apr*;29:19

Sato H., Schill W.B. (1987): Temperature-dependent effects of the components of kallikrein-kinin system on sperm motility in vitro. *Fertil Steril. Apr*;47:684.

Schill W.B., Haberland G.L. (1974): Kinin-induced enhancement of sperm motility. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem. Feb*;355:229.

Schill W.B. (1975): Stimulation of sperm motility by kinins in fresh and 24 hours aged human ejaculates. *Andrologia.* 7:135.

Schill W.B., Haberland G.L. (1975): Action of different components of the kallikrein kinin-system on sperm motility in vitro. *Klin Wochenschr. Jan* 15;53:73.

Schill, W. B., Preissler, G., Dittmann, B., Müller, W. P. (1979): Effect of pancreatic kallikrein, sperm acrosin and high molecular weight (HMG) kininogen on cervical mucus penetration ability of seminal plasma-free human spermatozoa. *Adv. Exp. Med. Biol.* 120B, 305.

Schill, W.-B., Feifel, M., Fritz, H., Hammerstein, J. (1981): Inhibitors of acrosomal proteinase as antifertility agents. A problem of acrosomal membrane permeability. *Int. J. Androl.* 4, 25.

Schill W.B., Miska W. (1992): Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. *Andrologia.* Mar-Apr;24:69.

Schill, W. B., Töpfer-Petersen, E., Heissler, E (1988): The sperm acrosome: functional and clinical aspects. *Hum. Reprod.* 3, 139.

Schill W. B., Parsch E. M., Miska W. (1994): Inhibition of angiotensin-converting enzyme--a new concept of medical treatment of male infertility? *Fertil Steril.* Jun;61:1123.

Sibony M., Gasc J.M., Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Corvol P. (1993): Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension.* Jun;21:827.

Siiteri, J. E., Dandekar, P. V., Meizel, S. (1988): Human sperm acrosome reaction initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. *J. Exp. Zool.* 246, 41.

Singh U. S. , Srivastava A. K. (1988): Angiotensin converting enzyme from capacitated rabbit spermatozoa: two distinct forms. *Andrologia.* Jul-Aug;20:322.

Somlev B., Helili K. (1996): Kinin-induced stimulation of bovine sperm motility and its relation to seminal plasma tissue kallikrein. *Immunopharmacology.* Jun;33:137.

Son, W. Y., Lee, J. H., Lee, J. H., Han, C. T. (2000): Acrosome reaction of human spermatozoa is mainly mediated by α_1H T-type calcium channels *Molecular Human Reproduction* vol.6 no.10, pp. 893.

Stambaugh, R., Buckley, J. (1970): Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus, monkey, and human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 3, 275.

Stambaugh, R. (1978): Enzymatic and morphological events in mammalian fertilization. *Gamete Res.* 1, 65.

Storey, B.T., Kopf, G.S. (1991): Fertilization in the mouse. II. Spermatozoa. In: *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization.* (eds.) Dunbar, B.S., O'Rand, M.G. Plenum Press, New York, pp. 167.

Stroth, U. & Unger, T. (1999): The renin-angiotensin system and its receptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 33 (Suppl 1) 21.

Swenson, C.E., Dunbar, B.S. (1982): Specificity of sperm-zona interaction. *J. Exp. Zool.* 219, 97.

Tatei, K., Cai, H., Ip, Y. T. & Levine, M. (1995): *Race*: a *Drosophila* homologue of the angiotensin converting enzyme. *Mech. Dev.* June, 51, 157.

Tesarik, J. (1985): Comparism of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A 23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fert.* 74, 383.

Tesarik, J., Drahorád, J., Peknicová, J. (1988a): Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertil. Steril.* 50, 133.

The CONSENSUS Trial Study Group (1987): Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med.* 316:1429.

The SOLVD Investigators (1991): Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. N Engl J Med. 325:293.

The SOLVD Investigators (1992): Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fraction. N Engl J Med. 327:685.

Toellner, R. (1990): Illustrierte Geschichte der Medizin. Andreas & Andreas Verlagsbuchhandel, Salzburg 1990.

Töpfer-Petersen, E., Henschen, A. (1987): Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. FEBS Lett 226, 18.

Urch, U.A., Patel, H. (1991): The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida, and with polysulfated polysaccharides. Development 111, 1165.

Urch, U.A., Wasrdrip, N.J., Hedrick, J.L. (1985a): Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. J. Exp. Zool. 233: 479.

Urch, U.A., Wasrdrip, N.J., Hedrick, J.L. (1985b): Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: the nature of the hydrolysis products. J. Exp. Zool. 236: 239.

Vanha-Perttula T., Mather J.P., Bardin C.W., Moss S.B., Bellve A.R. (1985): Localization of the antigotensin-converting enzyme activity in testis and epididymis. Biol Reprod. Nov;33:870.

Vantman D., Denison L., Banks S.M., Sherins R.J., Koukoulis G., (1989): Assessment of sperm motility characteristics form fertile and infertile men using a fully automated computer assisted semen analyser, Fertility & Sterility. 51: 156.

Vinson G.P., Ho M.M., Puddefoot J.R. (1995): The distribution of angiotensin II type 1 receptors, and the tissue renin-angiotensin systems. Mol Med Today. Apr;1:35.

Vinson G.P., Puddefoot J.R., Ho M.M., Barker S., Mehta J., Saridogan E., Djahanbakhch O. (1995): Type I angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J Endocrinol. Feb*;144:369

Vinson G.P., Mehta J., Evans S., Matthews S., Puddefoot J.R., Saridogan E., Holt W.V., Djahanbakhch O. (1996): Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regul Pept. Dec* 3;67:131.

Vinson, G. P., Saridogan, E., Puddefoot, J. R., Djahanbakhch, O. (1997): Tissue renin angiotensin systems and reproduction. *Human Reproduction* vol.12 no.4 pp.651.

Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S. (1990): The molecular basis of sperm capacitation. *J.Androl.* 19, 242.

Wassarman, P.M. (1987): The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235, 553.

Wennemuth G., Babcock D.F., Hille B. (1999): Distribution and function of angiotensin II receptors in mouse spermatozoa. *Andrologia. Sep*;31:323.

Williams T.A., Villard E., Prigent Y., Dadoune J.P., Soubrier F. (1995): A genetic study of angiotensin I-converting enzyme levels in human semen. *Mol Cell Endocrinol. Feb*;107:215.

Williams, W.L., (1972): Biochemistry of capacitation of spermatozoa. In: *Biology of mammalian fertilization*, Moghissi, K.S., Hafez, E.S.S. (eds.), CC Thomas, Springfield, Illinois, pp. 43.

Wolf, D.P. (1981): The mammalian egg's block to polyspermy. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Mastroianni, L., Biggers, J.D. (eds.), Raven Press, New York, pp. 183.

Wolff, H.H., Schill, W.-B., Moritz, P. (1976): Rundköpfige Spermatozoen: Ein seltener andrologischer Befund („Kugelkopfspermatozoen“, „Globozoospermie“). *Hautarzt* 27, 111.

Wong P.Y., Uchendu C.N. (1991): Studies on the renin-angiotensin system in primary monolayer cell cultures of the rat epididymis. *J Endocrinol. Nov*;131:287.

Wong P.Y., Uchendu C.N. (1990): *The role of angiotensin-converting enzyme in the rat epididymis. J Endocrinol. Jun;125:457.*

Yanagimashi, R., Nicolson, G.L., Noda, Y.D., Fujimoto, M. (1973): *Electron microscopic observations on the distribution of anionic residues in hamster spermatozoa and eggs before and during fertilization. J. Ultrastruct. Res. 43, 344.*

Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., Rogers, B.J. (1976): *The use of zona free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 15, 471.*

Yudin, A.I., Gottlieb, W., Meizel, S. (1988): *Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. Acta. Endocrinol. 27, 343.*

Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T., Kessler, M., Williams, W.L. (1971): *Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic and seminal plasma trypsin inhibitors. J. Reprod. Fertil. 25, 387.*

Zaneveld, L.J.D., DeJonge, C.J. (1991): *Mammalian Sperm Acrosomal Enzymes and the Acrosome Reaction. In: Dunbar, B.S., O'Rand, M.G. (eds.). A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. Plenum Press, New York, pp. 63.*

Zaneveld, L.J.D., DeJonge, C.J., Anderson, R.A., Mack, S.R. (1991): *Human sperm capacitation and the acrosome reaction. Hum. Reprod. 6, 1265.*

Zhao W., Leung P.Y., Chew S.B., Chan H.C., Wong P.Y. (1996): *Localization and distribution of angiotensin II in the rat epididymis. J Endocrinol. May;149:217.*

Zhou Y., Delafontaine P., Martin B.M., Bernstein K.E. (1995): *Identification of two positive transcriptional elements within the 91-base pair promoter for mouse testis angiotensin converting enzyme (testis ACE). Dev Genet. 16:201.*

Zheng S., Li Z., Wang Y.X., Xiang Z.Q. (2003): *Seminal plasma angiotensin II detection and its clinical implication], Zhonghua Nan Ke Xue. Dec;9:669.*

10. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. W.B. Schill für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der Proben und für die Benutzung des Labors. Die stets freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung durch meine Mitarbeiter haben den reibungslosen Ablauf der Versuche erst ermöglicht. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Müller, meiner Betreuerin, die mir stets hilfsbereit zur Seite stand. Weiterhin möchte ich mich beim Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion-im-Reproduktionsgeschehen“ bedanken und hier besonders bei Frau Dr. Hinsch und Herrn Professor Dr. Hinsch für die Teilnahme am Graduiertenkolleg und den damit verbundenen Hilfestellungen, den lehrreichen Unterrichtsstunden und Seminaren, die zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Professor Dr. Aumüller vom Anatomischen Institut der Universität Marburg danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und die Möglichkeit, die Methoden Immunzytochemie, Elektronenmikroskopie und Western-Blot zu lernen. Seinen Mitarbeiterinnen Frau Damshäuser und Frau Dr. Eickhoff danke ich für die sehr gute Unterrichtung in der Immunzytochemie und im Western-Blot. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Peters vom andrologischen Labor der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Unterstützung bei der Durchführung des ELISA und Herrn Dr. Miska für seine stets konstruktive und hilfreiche Kritik bedanken. Vielen Dank möchte ich an Herrn Dr. med. Braun richten, für die freundliche Überlassung der Ejakulat-Proben. Herrn Dr. Boedecker und Frau Scheibelhut von der Arbeitsgruppe „Medizinische Statistik“ am Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen danke ich herzlich für wertvolle Hinweise bei der Planung und Durchführung der wissenschaftlichen Arbeit und für die Durchführung der Statistik. Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. med. Rau und Herrn Dr. med. Breithecker vom Institut für Diagnostische Radiologie des Universitätsklinikums Giessen und Marburg aussprechen, die mir die notwendigen Freiräume zur Vervollständigung dieser Arbeit gaben.

11. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| AI | Angiotensin I |
| AII | Angiotensin II |
| AR | Akrosomreaktion |
| AT1 | Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 |
| AT2 | Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| cAMP | cyclisches Adenosin-3,5'-monophosphat |
| E | Extinktion |
| ECL | Enhanced ChemiLuminescence |
| FSH | Follikelstimulierendes Hormon |
| hCG | humanes Choriongonadotropin |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure |
| hFF | humane Follikularflüssigkeit |
| HSA | human serum albumin, menschliches Serumalbumin |
| HTF | human tubal fluid, Medium nach Quinn et al. (1985), |
| ICSI | intra-cytoplasmatic sperm injection, Mikroinjektion |
| IUI | Intrauterine Insemination |
| IVF | In Vitro Fertilisation |
| LHD | Lateral head displacement, seitliche Kopfauslenkung |
| LIN | Linearität |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| r | Korrelationskoeffizient |
| RA(A)S | Renin-Angiotensin (Aldeosteron)-System |
| RT | Raumtemperatur |
| SEM | standard error of the mean, Standardabweichung |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan |
| VAP | average-path-velocity, Pfadgeschwindigkeit |
| VCL | curve-linear-velocity, Spurgeschwindigkeit |
| vs | versus |
| VSL | straight-linear-velocity, Progressivgeschwindigkeit |
| WHO | World Health Organization |
| ZP | Zona pellucida |

11. Curriculum vitae

Enrique Alejandro Lafont

Arzt

Persönliche Angaben

Geboren am 02. Oktober 1975 in Wissen
Staatsangehörigkeit spanisch
Familienstand Verheiratet, ein Kind
Eltern Esther Lafont Martinez
Manuel Alejandro Sanchez
Geschwister Manuel Alejandro Lafont

Schulische Ausbildung

1982 - 1986 Grundschule Betzdorf
1986 - 1995 Gymnasium mit Abitur am Städtischen
Ganztagsgymnasium am Rosterberg in Siegen

Berufspraxis vor dem Studium

09/1995 - 02/1996 Elisabeth-Krankenhaus Kirchen, Krankenpflegeschule

Universitäre Ausbildung

04/1996 - 03/1997 Studium der Philosophie an der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms- Universität Bonn und an der
Justus-Liebig- Universität Giessen (JLU-Giessen)
04/1997 - 06/2004 Medizinstudium an der JLU Giessen

Klinische Ausbildung

06/2004 – 08/2004 Arzt im Praktikum in der Abteilung Hämatologie
und Onkologie, Marienkrankenhaus Siegen,
Professor Dr. W. Gassmann
09/2004 – 09/2005 Arzt im Praktikum, ab dem 01. 10. 2004
Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-,
Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie
des Universitätsklinikums Giessen und Marburg,
Professor Dr. W. Padberg

Seit 09/2005 Assistenzarzt in der Abteilung Diagnostische Radiologie des
Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Professor Dr. W.S.
Rau

Forschung

04/2000-07/2001 DFG-Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im
Reproduktionsgeschehen Hautklinik der JLU Gießen

Fortbildungen und Seminare

SS99 „Aktuelle Probleme der Virologie und molekularen
Onkologie“ JLU Giessen

05.10.1999 -15.10.1999 Pharmakologisches Praktikum der Firma Hoechst
Marion-Roussel, Frankfurt am Main

04/2000-06/2002 Fortbildungen im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs
Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen

WS 2001/2002 Interdisziplinäre Ringvorlesung Ultraschalldiagnostik und
interdisziplinärer Grundkurs Sonographie nach den
Richtlinien der DEGUM, JLU Giessen

WS 01/02 und
SS 02 Kurs der klinischen Elektrokardiographie Teil 1 und Teil 2
JLU Giessen

10./11. und 17. 09. 2005 Notfallseminar

Weitere Tätigkeiten

SS 99 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Biochemie
JLU Giessen

SS 99 bis WS00/01 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Physiologie
JLU Giessen

SS01 bis SS02 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Anatomie
JLU Giessen

SS01, WS02/03
SS03 Studentischer Mentor in der Studieneinführungswoche
JLU Giessen

Giessen, 21. Dezember 2005

Enrique Alejandro Lafont