

**Charakterisierung und immunologische Untersuchung von
Seren von Sterilitätspatienten mit Entzündungszeichen im
Genitaltrakt vor
Initiation einer antientzündlichen Behandlung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Win See Lam
aus Mayen

2015

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. H. van der Ven
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Haidl

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.03.2015

Aus dem Zentrum für Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. H. van der Ven
Geschäftsführender Direktor der Klinik: Prof. Dr. W. Kuhn

**Meiner großen Liebe Michael
&
unseren wunderbaren Kindern
Samuel, Seraphia, Aurelian**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
2. Material	21
2.1 Liste der Chemikalien.....	21
2.2 Liste der Geräte und Materialien	23
2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	25
2.4 Patientenseren, Ejakulate	28
2.5 Gewebeproben	28
3. Methoden	29
3.1 SDS-PAGE und Westernblot	29
3.1.1 Prinzip des gekoppelten Verfahrens	29
3.1.2 Herstellung der Gewebeextrakte für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	30
3.1.2.1 Aufbereitung der Organe Hoden und Niere.....	30
3.1.2.1.1 Gewebserkleinerung	30
3.1.2.1.2 Aufbrechen der Proteine	30
3.1.2.1.3 Aufbereitung mit Laemmli-Lösung.....	30
3.1.2.2 Aufbereitung der Spermien	31
3.1.2.2.1 Waschen der Spermien.....	31
3.1.2.2.2 Aufbrechen der Proteine	31
3.1.2.3 SDS-PAGE	31
3.1.2.4 Coomassie-Färbung.....	32
3.1.3 Erstellen des 12% SDS-Polyacrylamidgels.....	32
3.1.3.1 Das Trenngel (= Laufgel)	32
3.1.3.1.1 Zusammensetzen der Kammer	32
3.1.3.1.2 Trenngel (= Laufgel) pipettieren	33
3.1.3.2 Das Sammelgel.....	33
3.1.3.3 Vorbereiten der Proteinproben.....	34
3.1.3.4 Auftragen der Proben in die Geltaschen	34
3.1.3.5 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine	35
3.1.4 Blotten.....	36

3.1.4.1	Vorarbeiten	36
3.1.4.2	Blotten der Gele	37
3.1.4.3	Färben der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S.....	37
3.1.4.4	Blocken der unspezifischen Bindungsstellen	38
3.1.4.5	Inkubation mit primärem Antikörper (1. AK)	38
3.1.4.6	Inkubation mit sekundärem Antikörper (2.AK).....	38
3.1.4.7	Alkalische Phosphatase Färbung.....	39
3.2	Immunfluoreszenz.....	39
3.2.1	Erstellen und Färben der humanen Spermienpräparate	40
3.2.1.1	Fixierung	40
3.2.1.2	Triton X–Bad	40
3.2.1.3	Inkubation mit primärem Antikörper (1. AK)	40
3.2.1.4	Inkubation mit sekundärem Antikörper (2. AK).....	41
3.2.1.5	Hoechst Bis-Benzimid 33342 Färbung.....	41
3.2.1.6	Versiegelung der Objektträger (OT).....	41
3.2.1.7	Mikroskopische Betrachtung	42
3.3	Indirekter Immunobeadassay	42
3.3.1	Vorbereitung der Reagenzien	42
3.3.2	Herstellung der Spermisuspension	43
3.3.3	Inkubation mit primärem Antikörper (1.AK)	43
3.3.4	Inkubation mit sekundärem Antikörper (2. AK).....	43
3.3.5	Mikroskopische Betrachtung	43
4.	Statistische Auswertung.....	44
5.	Ergebnisse	44
5.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	44
5.1.1	Anamnestische und klinische Daten	44
5.1.2	Auswertung der Spermioграмme	45
5.1.3	Auswertung weiterer Parameter.....	46
5.1.4	Ergebnisse des Westernblot im Patientenkollektiv	47
5.1.5	Ergebnisse der Immunfluoreszenz im Patientenkollektiv	47
5.1.6	Ergebnisse des indirekten Immunobeadassays im Patientenkollektiv	48
5.2	Ergebnisse des Westernblot	48

5.2.1	Relevante Banden.....	49
5.2.1.1	Reaktionen an Bande 6.....	50
5.2.1.2	Reaktionen an Bande 8.....	50
5.2.1.3	Reaktionen an Bande 9 (= 97 kDa).....	51
5.2.1.4	Reaktionen an Bande 13.....	52
5.2.1.5	Reaktionen an Bande 17 (= 67 kDa).....	53
5.2.1.6	Reaktionen an Bande 22.....	53
5.2.1.7	Reaktionen an Bande 26.....	54
5.2.2	Statistische Werte der Banden für humane Reproduktionsgewebe	55
5.3	Korrelationsergebnisse	55
5.3.1	Beispielrechnung für eine Korrelation	56
5.3.2	Korrelationen der Daten	57
6.	Diskussion.....	59
7.	Ausblick.....	68
8.	Zusammenfassung.....	69
9.	Anhang.....	71
10.	Literaturverzeichnis	123
	Danksagung.....	135

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AHA	Antihodenantikörper
AK	Antikörper
AmHA	Antimaushodenantikörper
AmNA	Antimausnierenantikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxydsulfat
ARA	Antikörper gegen Antigene des reproduktiven Traktes
ASA	Antispermienantikörper
ATA	Antitestikuläre-Antikörper
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-indol-Phosphat
BHS	Blut-Hoden-Schranke
Bisacrylamid	N,N-Methylenbisacrylamid
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CaCl ₂	Calciumchlorid
CF	Zystische Fibrose
DTT	Dithiothreitol (threo-1,4-Dimercapto-2,3-Butandiol)
EDTA	Disodiummethylen-diamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immuno-sorbent assay
EtOH	Ethanol
FCM	Flowcytometrie
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSH	Follikelstimulierende Hormon
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HoH	Humane Hodenproteine
HoM	Hodenproteine der Maus
IBT	Immunobead-Test (Immunobeadassay)
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion

IL	Interleukin
IVF	In-vitro-Fertilisation
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LH	Luteinisierende Hormon
M	Marker
mA	Milliampere
MAR	Mixed antiglobulin reaction
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MgCl_2	Magnesiumchlorid
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Magnesiumchloridhexahydrat
min	Minuten
Mio	Millionen
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblue-Tetrazolium
NiM	Nierenproteine der Maus
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
o.p.B.	Ohne pathologischen Befund
OT	Objekträger
PBS	Phosphat buffered saline
PCO	Polyzystisches Ovarialsyndrom
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro minute (rounds per minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde

SpH	Humane Spermien
TAT	Tray agglutination test
TBS	Tris-buffered-saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
Tris	Tri-(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Einheit
V	Volumen
w	Gewicht (weight)
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

Die Reproduktionsmedizin ist ein medizingeschichtlich sehr junges interdisziplinäres Fach, was die Fachgebiete Gynäkologie, Urologie, Dermatologie und internistische Endokrinologie sowie die klinische und theoretische Reproduktionsgenetik wie auch die basiswissenschaftlich orientierte Reproduktionsbiologie vereint (DGRM, 2008).

Besondere Brisanz erlangte die Reproduktionsmedizin, als 1978 das erste Retorten-Baby in London geboren wurde (Steptoe und Edwards, 1978). Seither werden die Entwicklungen und Fortschritte der Reproduktionsmedizin ständig vor moralischen, ethischen und rechtlichen Hintergründen diskutiert.

Dabei hat gerade die Fortpflanzungsmedizin durch In-vitro-Fertilisations- (IVF-) und Intracytoplasmatische Spermieninjektions- (ICSI-) Behandlungen trotz aller Kritik gerade zum Thema ungewollte Kinderlosigkeit die letzten dreißig Jahre Erstaunliches geleistet. 1991 ging man noch von einer Prävalenz der Sterilität bei der deutschen Bevölkerung von etwa 15 % der Paare im reproduktionsfähigen Alter aus (Brückert, 1991).

Wissenschaftlichen Schätzungen 2001 zufolge lag der Prozentsatz der Paare in Deutschland, die ungewollt kinderlos sind, in den alten Bundesländern deutlich unter 10 %, in den neuen Bundesländern unter 5 % (Brähler et al., 2001), während später eine repräsentative Befragung der Bevölkerung im Alter von 18 bis 50 Jahren ergab, dass nur 1 % der Bevölkerung von primärer Sterilität betroffen ist (Meister et al., 2004).

Unter Sterilität versteht man hierbei, wenn keine Schwangerschaft nach mehr als zweijährigem, regelmäßigem, ungeschütztem Sexualverkehr eines Paares eintritt (ICD-10 Diagnosen: Sterilität der Frau [N97.x], Sterilität des Mannes [N46]). Man unterscheidet zusätzlich die primäre Sterilität von der sekundären: Bei der primären war die Frau noch nie schwanger, bei der sekundären fanden bereits eine oder mehrere Konzeptionen statt, eine erneute Schwangerschaft tritt aber trotz regelmäßiger Kohabitation nicht ein.

Infertilität ist definiert als die Unfähigkeit, eine Schwangerschaft bis zur Geburt eines lebensfähigen Kindes auszutragen (Gnoth et al., 2003). Zwischen beiden Begriffen wird

im Angelsächsischen aber nicht unterschieden und auch im deutschsprachigen Raum werden beide Begriffe mittlerweile synonym für Sterilität gebraucht, um eine Stigmatisierung durch den Begriff Sterilität zu vermeiden.

Die männliche Subfertilität beschreibt die Einschränkung oder Unfähigkeit der Befruchtungsfähigkeit des Spermas (Würfel, 2007).

Die Ursache für Sterilität ist vielfältig. Bei etwa 40 % der Fälle findet sie sich bei der Frau, bei 40 % beim Mann. Eine Ursache bei beiden Partnern ist bei etwa 10 % der Betroffenen der Fall. Bei 10 % der Fälle kann keinem der Partner eine klare Ursache zugeordnet werden (Esterbauer, 2009).

Da bei einigen der ungewollt kinderlosen Paare Konzeptionsstörungen bei beiden Partnern zu finden sind, ist oft eine absolute Trennung in männliche und weibliche Sterilitätsursachen nicht möglich (Agarwal, 2005).

Es wird aber angenommen, dass 10-20 % der Partnersterilität durch psychogene Faktoren bedingt sind (Appelt et al., 1986).

Um eine spezifische Ursache einer Fertilitätsstörung beim Mann zu finden, wird der Patient einer umfassenden andrologischen Untersuchung unterzogen. Zur klinischen Beurteilung der betroffenen Männer gehört eine umfangreiche Anamnese und eine körperliche Untersuchung mit Hodensonographie. Zur Bestimmung der männlichen Fertilität werden die durch das Spermogramm bestimmten Werte für Spermindichte, Spermienmotilität und Spermienmorphologie herangezogen (Haidl, 2006).

Weitere wichtige diagnostische Maßnahmen sind die Hormonuntersuchung zur Bestimmung der LH-, FSH-, Testosteron-, Estradiol-, und Prolaktinspiegel. Trotzdem bleibt bei ca. 30 bis 50 % der Männer die Ätiologie der Fertilität unbekannt (Maier et al., 2000).

Mögliche andrologische Ursachen, die eine Subfertilität erklären oder zu einem eingeschränkten Spermogramm führen, wären (Steck, 2001; Esterbauer, 2009):

- Varikozele (varizenartige Erweiterung der Venen des Plexus pampiniformis), bei bis zu 35 % der infertilen Männer zu finden
- Kryptorchismus (Lageanomalien des Hodens, Aplasie des Keimepithels, etc.)
- Hormonstörungen (hyper- und hypogonadotroper Hypogonadismus, Schilddrüsenerkrankungen)
- Bakterielle und virale (z. B. Mumps) Infektionen
- Immunologische Erkrankungen
- Psychische Konflikte
- Allgemeinerkrankungen (Diabetes mellitus)

Exogene Einflüsse wie Varikozelen, Schäden durch thermische, entzündliche, toxische bzw. traumatische Einflüsse auf Hoden, Nebenhoden und samenabführende Wege können bei ca. einem Drittel der Fälle zu Sterilität oder Subfertilität führen (Schill, 1981). Ebenso können Stoffwechselstörungen (Ebisch et al., 2006) oder chromosomale Aberrationen (Ludwig et al., 2004) einen Einfluss auf die Fertilität haben. Noch nicht abschließend geklärt ist, ob durch Toxine (z.B. im Tabakrauch) die Anzahl der gesunden Spermien abnimmt (Ramlau-Hansen et al., 2007; Paasch et al., 2008). Keinen schädlichen Einfluss auf die männliche Infertilität scheint mäßiger Alkoholkonsum zu haben, wohl aber exzessives Trinken, was zu ausgeprägten testikulären und endokrinologischen Schäden führen kann (Hagemann und Haidl, 2002). Das Alter des Mannes scheint ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Fertilität einzunehmen. So reduzieren sich das Spermavolumen und die Motilität mit steigendem Alter. Ebenso lässt sich eine zunehmende Einschränkung der Spermatozoenmorphologie nachweisen (Hagemann und Haidl, 2001). Zusätzlich beginnt ab dem 4. Lebensjahrzehnt die Testosteron-Produktion abzusinken. Bis zum 70. Lebensjahr verringern sich die Testosteron-Konzentrationen im Blut um ca. 30 %. Die interdisziplinäre Arbeitsgruppe „Der alternde Mann“ um Prof. Haidl gibt im Jahr 2000 eine Entscheidungsgrenze von 12,0 nmol/l (3,5 µg/l) an, welche nach einer neuen Studie ca. 60 % aller Männer über 50 Jahren unterschreiten (DPC Biermann GmbH, 2001). Auch Mutationen als Ursache für Infertilität werden diskutiert. So haben Van der Ven et al. (1996) bei 14 von 80 Patienten mit verminderter Spermienqualität (17,5 %) mindestens eine Mutation im CFTR-Gen nachgewiesen, was sonst die zystische Fibrose (CF) oder Mukoviszidose bedingt.

Tab. 1: Indikationen für IVF-/ICSI-Behandlungen (Nach: Deutsches IVF-Register 2009)

Befunde bei der Frau für IVF-Behandlungen		Befunde beim Mann für IVF-Behandlungen	
Normal (o.p.B.)	22,64 %	Normal (o.p.B.)	47,21 %
Tubenpathologie	31,58 %		
Endometriose	9,52 %		
Hyperandrogenämie, Polyzystisches Ovarialsyndrom	4,38 %		
Pathologischer Zyklus	6,72 %	Eingeschränktes Spermiogramm	30,34 %
Psychogene Faktoren	0,16 %		
Sonstige (Spermienantikörper, pathologischer Zervixfaktor, u.a.)	19,62 %	Sonstige (Pathologische Funktionstests, u.a.)	22,45 %
Keine Angaben	5,37 %		
Befunde bei der Frau für ICSI-Behandlungen			
Befunde bei der Frau für ICSI-Behandlungen		Befunde beim Mann für ICSI-Behandlungen	
Normal (o.p.B.)	43,66 %	Normal (o.p.B.)	7,46 %
Tubenpathologie	9,34 %		
Endometriose	5,77 %		
Hyperandrogenämie, Polyzystisches Ovarialsyndrom	4,65 %		
Pathologischer Zyklus	6,87 %	Eingeschränktes Spermiogramm	71,47 %
Psychogene Faktoren	0,10 %	Azoospermie	3,47 %
Sonstige (Spermienantikörper, pathologischer Zervixfaktor, u.a.)	22,44 %	Sonstige (Pathologische Funktionstests, u.a.)	17,60 %
Keine Angaben	7,17 %		

Dem deutschen IVF-Register (siehe Tabelle 1) kann man entnehmen, welche Befunde im Jahr 2009 eine Indikation für eine IVF- oder ICSI-Behandlung (Mehrfachindikationen) dargestellt haben.

Laut der World Health Organisation - WHO (1992) gelten folgende Normwerte für das Ejakulat:

- durchschnittlich 2,6-6 ml Ejakulat, untere Grenze der Norm 2,0 ml
- pH 7,2-7,8; Verflüssigungszeit 15-30 min
- 40-250 Millionen Spermatozoen/ml, untere Grenze der Norm 20 Millionen/ml
- mehr als 50 % vitale Spermatozoen
- mehr als 50 % Spermatozoen mit Vorwärtsbeweglichkeit oder mehr als 25 % mit schneller linearer Beweglichkeit 60 min. nach Probengewinnung
- mehr als 50 % Spermatozoen mit normaler Form
- 0,25-2 % Zellen der Spermiogenese

Für die Einschränkung der Spermienqualität gelten folgende Richtlinien (WHO, 1992):

- Parvispermie bei Ejakulatvolumen unter 2 ml
- Oligozoospermie bei einer Spermiedichte von unter 20 Mio/ml
- Asthenozoospermie bei weniger als 50 % normal beweglicher Spermien
- Teratozoospermie bei weniger als 30 % Spermien mit normaler Morphologie

Bostoffe et al. (1982a und 1982b) nahmen an, dass Spermiedichte und Spermienmorphologie am engsten mit der Fruchtbarkeit korrelieren. In ihrer ersten Untersuchung zeigten sie den Zusammenhang zwischen der Spermiedichte und der Zeugungskraft des Mannes (1982a). Die zweite Studie (1982b) ergab eine deutliche Korrelation zwischen der Anzahl der morphologisch abnormen Spermien und der Wahrscheinlichkeit für das Eintreten einer Schwangerschaft. Für Holland-Moritz und Krause (1992) galten die vorwärts gerichtete Beweglichkeit und die Spermienmorphologie als wichtigste Parameter. 1997 zeigten Ombelet et al., dass der Einfluss der Spermienmorphologie auf die Fruchtbarkeit von größerer Bedeutung war als die Spermiedichte.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einer Charakterisierung und immunologischen Untersuchung von Seren von Sterilitätspatienten mit Entzündungszeichen im Genitaltrakt vor Initiation einer antientzündlichen Behandlung. Von einer „immunologischen Infertilität“ kann man sprechen, wenn Antispermienantikörper (ASA) als Autoantikörper beim Mann oder als Isoantikörper bei der Frau vorliegen, welche die Spermatozoen-Eizell-Interaktionen und damit die Fertilisierung beeinträchtigen (Krause et al., 2002). ASA beim Mann können eine Autoimmunkrankheit darstellen (Rose und Bona, 1993).

Die Vorläufer der Keimzellen wandern pränatal in das zukünftige Hodengewebe als Gonozyten ein, ihre Differenzierung in Spermien beginnt aber erst in der Pubertät. Keimzellspezifische Antigene werden im Verlauf der Spermatogenese exprimiert. Aufgrund der gleichzeitigen Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke (BHS), entgehen sie den Toleranzmechanismen des Organismus und bleiben daher Autoantigene. Zusätzlich exprimieren die basalen Keimzellen, die außerhalb der BHS liegen, auch keimzellspezifische Antigene, welche grundsätzlich als fremd erkannt werden, aber keine Immunantwort auslösen (Pöllänen und Cooper, 1994). Diese zusätzliche Immunsupprimierung wird wahrscheinlich durch lokale Immunsuppression ermöglicht, wobei möglicherweise neben den interstitiellen Leydig-Zellen auch Endothelzellen bei der Inaktivierung interstitieller Lymphozyten eine Rolle spielen. Aber auch systemischen Toleranzmechanismen wird eine autoprotektive Bedeutung gegenüber auto-reaktiven T-Zellen zugeschrieben (Tung und Teuscher, 1995). Diese Unterdrückung der Immunreaktionen im Hoden soll verhindern, dass die männlichen Keimzellen, die während der Pubertät erstmals gebildet werden, vom eigenen Immunsystem erkannt und bekämpft werden.

Einen Zusammenbruch der Immuntoleranz gegenüber Spermien und damit die Entstehung von ASA können bewirken (Witkin, 1988):

- Verlust in Zahl oder Aktivität von T-Supressorzellen
- Verlust von T-Supressorzell aktivierenden, seminalplasmatischen Faktoren
- Veränderte Spermienantigenität, die nicht mehr die zuverlässige Immunsuppression bewirken kann

- Zusammenbruch der Bluthodenschranke (BHS) bzw. Invasion von Blutextravasaten ins periepididymale oder periduktale Gewebe mit Inokulation von Spermiantigenen

Inwieweit nur hohe Konzentrationen von ASA mit Fertilitätsstörungen assoziiert sind, wird kontrovers diskutiert. Während Abshagen et al. 1998 eine hohe Konzentration postulierten, stellten Eggert-Kruse et al. 1989 dies in Frage.

Im Serum findet man überwiegend IgG als ASA, im Ejakulat oder im Zervixmucus IgA. Nur wenn komplementbindende Antikörper vorliegen, hat die Art der ASA einen Einfluss auf die Spermatozoenfunktion. Nicht reproduzierbar hingegen sind die vielen Berichte in der älteren Literatur über unterschiedliche Effekte verschiedener Immunglobulinklassen (Naz, 2004).

Die letzten Jahre haben verschiedene Wissenschaftler unterschiedliche Spermatozoenfunktionen und ihre möglichen Störungen durch immunologische Mechanismen untersucht. Im Mukustest kann man nachweisen, dass die Migration der Spermatozoen durch das Zervikalsekret über eine Interaktion der an die Zelloberfläche der Spermatozoen gebundenen IgA mit den Glykoproteinmizellen des Zervikalsekrets unterbunden wird. Daraufhin lässt sich das Shaking Phänomen beobachten, eine unphysiologische Schüttelbewegung der Spermatozoen unter Einbuße der progressiven Beweglichkeit (Kremer und Jager, 1992).

Zusätzlich zu ASA wurden von Montag und van der Ven (1997) bei einer Gruppe von Männern, die an einer Azoospermie oder Oligoasthenoteratozoospermie (OAT) litten, auch Anti-Testikuläre-Antikörper nachgewiesen, welche in der gesunden Kontrollgruppe nicht gefunden werden konnten. In einer weiteren Studie wiesen Montag et al. (1998) Anti-Testikuläre-Antikörper bei Patienten nach, an denen eine testikuläre Spermienextraktion (TESE) für eine intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) durchgeführt wurde. Bei nur 43 % dieser Patienten fiel der durchgeführte IgA-ELISA zur Detektion von ASA positiv aus. Anhand dieser Untersuchungsergebnisse stellte sich die Frage, ob die TESE zur Autoimmunreaktion gegen Hodengewebe geführt oder ob die Autoantikörper primär die Hodenfunktion so gestört hatten, dass eine TESE notwendig geworden war.

Unveröffentlichte Ergebnisse einer Untersuchung von Siebmann, Montag und van der Ven zeigten eine mögliche Korrelation zwischen dem Vorkommen von Anti-Testikulären-Antikörpern und dem Nachweis erhöhter Entzündungsparameter im Serum unfruchtbarer Patienten auf. In einer anderen Studie konnte die Hypothese gestützt werden, dass eine chronische Infektion oder Entzündung die Entstehung einer Autoimmunreaktion gegen Hodengewebe begünstigt, da eine antiphlogistische und antibiotische Therapie in einigen Fällen die Spermienqualität infertiler Patienten verbessern konnte. Besonders eindrucksvoll wurde dies bei einem Patienten beschrieben, welcher eine nichtobstruktive Azoospermie und erhöhte Leukozytenwerte im Sperma aufwies, was eine genitale Infektion vermuten ließ. Aufgrund dessen wurde der Patient 8 Wochen antiinflammatorisch mit Diclofenac und Doxycyclin behandelt. Die folgenden Kontrollen zeigten eine verminderte Leukozyten-Zahl und wenige, aber bewegliche Spermatozoen, die ausreichend an Zahl und Qualität waren, um bei dem Patienten zwei ICSI-Behandlungen durchzuführen ohne ihn einer Hodenbiopsie unterziehen zu müssen. Beim dritten ICSI-Versuch wurde vorher keine anti-entzündliche Therapie durchgeführt, so dass sich wieder das Bild der Azoospermie und Leukozytospermie zeigte (Montag, van der Ven, Haidl, 1999). Daraus schlossen die Autoren, dass im Fall einer Azoospermie, die von einer chronischen genitalen Infektion begleitet wird, einige Patienten von einer anti-entzündlichen Behandlung vor und während der ICSI profitieren. Die auf diese Weise gewonnene Anzahl der Spermatozoen reicht in drei von vier Fällen aus, um zu einer Schwangerschaft zu führen.

MHC II Moleküle und die proinflammatorischen Cytokine Interleukin 1 und TNF- α werden von Makrophagen produziert, welche 25 % der interstitiellen Zellen im adulten Hoden ausmachen. Diese bilden die zweitgrößte Zellpopulation im testikulären Interstitium, da auf 10-50 Leydig-Zellen ein Makrophage kommt (Weinbauer et al., 2000).

Verglichen mit anderen Histozyten werden aber von den Gewebsmakrophagen im Hoden deutlich geringere Mengen an entzündungsfördernden Substanzen gebildet. Es besteht die Theorie, dass die zahlreichen cytoplasmatischen Zell-Zell-Kontakte der Gewebsmakrophagen mit den Leydig-Zellen dabei eine Rolle spielen (Hedger, 1997).

Die WHO definiert eine Leukozytospermie ab einer Leukozytenkonzentration von mehr als 106/ml Seminalplasma. (WHO, 1999).

Einen Überblick über die derzeit gängigen Nachweismethoden für Antispermien-Antikörper gibt die Tabelle 2. Allerdings ist keine von diesen Methoden von allen Arbeitsgruppen akzeptiert und standardisiert (Helmshorst et al., 1999).

Tab. 2: Nachweismethoden für Antispermienantikörper (nach: Krause, 2008)

Bezeichnung	Prinzip	Vorteile	Nachteile
Tray agglutination test (TAT)	Beobachtung der Agglutination	Keine Reagenzien erforderlich	Subjektiv, unspezifisch
Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA)	Antispermienantikörper-Bindung an fixierte Antigene	Industriell vorgefertigte Reagenzien, objektive Ergebnisse	Fehlende Definition der Antigene
Mixed antiglobulin reaction (MAR) WHO-Empfehlung	Bindung von Latexpartikeln an motile Spermatozoen	Industriell vorgefertigte Reagenzien, schnelle Durchführung	Fehlende Antigen-spezifität
Immunobead-Test (IBT) WHO-Empfehlung	Bindung von Polystyrol-beads an Spermatozoen	Industriell vorgefertigte Reagenzien, schnelle Durchführung	Fehlende Antigen-spezifität
Flowcytometrie (FCM)	Bindung von markierten Immunglobulinen	Hohe Genauigkeit des Prozentsatzes Antispermienantikörper bindender Spermatozoen	Subjektiv, Immunglobulinspezifisch
Immunfluoreszenz	Bindung von markierten Immunglobulinen in situ	Zelluläre Lokalisation der Antispermienantikörper sichtbar	Hohe Titer notwendig

Ein guter Entzündungsindikator, auch bei klinisch stummen Entzündungen, ist die Granulozytenelastase, welche proteolytische Schäden an den Spermatozoen verursachen kann (Haidl et al., 2008; Henkel et al., 2007; Wolf et al., 1991; Zorn et al., 2000). Der Normalwert der Granulozytenelastase liegt bei < 250 ng/ml Seminalplasma. Konzentrationen zwischen 250 und 1000 ng/ml weisen auf eine mäßige, Werte über 1000 ng/ml auf eine massive Entzündung hin (Haidl, 2003).

Bei einer Entzündung des Genitaltraktes nimmt sowohl die Ejakulatqualität (Barrat et al., 1990; Wolff et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992) als auch die Fertilität deutlich ab (Cohen et al., 1985; Talbert et al., 1987), wie zahlreiche Studien belegen. Die genaue Ätiologie ist allerdings nicht geklärt, weswegen die vorliegende Arbeit untersucht, ob Autoimmunantikörper gegen Hoden- oder Spermiengewebe bei Sterilitätspatienten mit Entzündungszeichen im Genitaltrakt vorliegen und ob sich die Ergebnisse verallgemeinern lassen. Auch soll aufgezeigt werden, inwieweit die verschiedenen Testungen wie Immunobeadassay, Immunfluoreszenz, ELISA oder Immunoblot für eine Detektierung von Antikörpern gegen Antigene des reproduktiven Traktes im klinischen Alltag geeignet sind. Ziel soll es sein, Patienten möglichst gut zu katalogisieren, um schon im Vorfeld eine Angabe über eine mögliche Erfolgsrate einer antiphlogistischen oder antibiotischen Therapie zu machen.

2. Material

2.1 Liste der Chemikalien

Chemikalie	Firma	Bestellnummer
Aceton	Merck	100014.101
Acrylamid Page	Pharmacia Biotech	17-1302-02
Ammonium Persulfat	Serva	13775
Ampuwa	Fresenius Kabi	40676.00.00
Antikörper (sekundäre)		
Goat Anti-Human IgG alkal. Phosphatase	Sigma	A 8542
Goat Anti-Human IgG FITC	Sigma	F 5512
Immunobead Rabbit Anti- Human-IgG (H+L) Reagent	Irvine Scientific	15378
Aprotinin	Sigma	A 4529
BCIP	Sigma	B 6777
Bisacrylamid	Pharmacia Biotech	17-1304 01
Bis-Benzimid	Hoechst	33342
Bromphenolblau	Serva	15375
BSA (Cohn Fraktion V)	Serva	11925
1-Butanol	Sigma	Bt-105
CaCl ₂	Sigma	C-5426
Chloroform	Merck	1.00983.2511
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva	17525
N,N-Dimethylformamid	Sigma	D 8654
DTT	Sigma	D 9779

Chemikalie	Firma	Bestellnummer
EDTA	Serva	11280
Essigsäure 100 %	Merck	1.000.63.1011
Ethanol absolut	Merck	1.00983.2511
Formalin	Aldrich	25.254-9
Glycin (Elektroph. Grad)	Sigma	G 7403
Glucose	Aldrich	15.896-8
Glycerol	Merck	1.04094.0500
HCl 25 %	Merck	100316.1000
KCl	Sigma	P 9541
KH ₂ PO ₄	Sigma	P 5379
Leupeptin	Sigma	L 8511
β-Mercaptoethanol	Sigma	M 6250
Methanol	Merck	1.06009.1011
MgCl ₂	Sigma	28305
MgCl ₂ -6H ₂ O	Sigma	28306
Milchpulver	Merck	1.15363.0500
N (fluid)	Aldrich	29.557-4
NaCl	Merck	1.06404.1000
NaHCO ₃	Merck	1.06329.0500
NaH ₂ PO ₄	Merck	6364
Na ₂ HPO ₄	Merck	6586
NaOH	Merck	9137
NBT	Sigma	N 6639
Paraformaldehyd	Sigma	P 6148
PMSF	Sigma	P 7626
Poly-L-Lysin	Sigma	P 8954

Chemikalie	Firma	Bestellnummer
Ponceau S	Sigma	P 3504
Proteinaseinhibitorcocktail (10X)	Sigma	P 2714
SDS	Serva	20763
SDS-Page-Standard-Marker (Low-Range)	Serva	39209.01
Sulfosalicylsäure	Sigma	S 2130
TEMED	Serva	35925
Trichloressigsäure	Sigma	T 9159
Tris (anal. gr.)	Serva	337180
Triton X	Sigma	X 100
Tween 20	Sigma	P 7949
Vectashield	Vector Laborat. Inc.	H 1000

2.2 Liste der Geräte und Materialien

Gerät/Material	Firma
Biofuge pico Tischzentrifuge	Heraeus Instruments, Osterode
Deckglas	Marienfeld, Deutschland
Dual Gel Caster, Mighty Small SE 245	Hoefer Scientific Instruments, S.F., USA
Einschweißgerät Polystar	Rische & Herfurth GmbH, Hamburg
Feinpipetten	Labsystems, Helsinki, Finnland
0,5 µl – 10 µl	
5 µl – 40 µl	
40 µl – 200 µl	
200 µl – 1000 µl	

Gerät/Material	Firma
Feinwaage Sartorius	Waagen-Prümm, Köln
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Gel Electrophoresis Unit, Mighty Small II SE 250	Hoefer Scientific Instruments, S.F., USA
Grobwaage Mettler P Roon	Mettler Waagen, GmbH, Gießen, Schweiz
Inverses Mikroskop Leica DMI-RB Objektiv: PL Fluotor x 100/1.3-0.6 Oil Grün-/Rotfilter: Bandpassfilter 450-560 nm, Farbteiler 580 nm, Sperrfilter 590 nm UV-Filter: Bandpassfilter 395-425 nm, Farbteiler 425 nm, Sperrfilter 450 nm	Leica Microscopie Systeme GmbH, Wetzlar
Millipore 0,22 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Mini-Shaker	Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
Nitrozellulosemembran Protran Porengröße 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Objektträger 76 mm x 26 mm	Engelbrecht, Edermünde
Phasenkontrastmikroskop Leica DMIRB Objektiv: x 40	Leica Microscopie Systeme GmbH, Wetzlar
pH-Meter WTW pH 530	Wissenschaftliche Werkstätten, Weilheim
Power-Supply, Blue Power	Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg
Reaktionstubes (1,5 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Rundbodenröhrchen Falcon 2001 (15 ml) Falcon 2003 (5 ml)	Becton Dickinson Lab. Franklin Lakes, N.Y., USA
Transblott SD SEMI-DRY Electrophoretic Transfer Cell	BIO-RAD Laboratories GmbH, München

Gerät/Material	Firma
Vortex, Kms 1 Minishaker	IKA-Works Inc., Wilmington, NC, USA
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Acrylamid-Stock

29,22 g Acrylamid PAGE
0,78 g Bisacrylamid
ad 100 ml H₂O

Alkalische Phosphatase (AP)

Färbelösung

(für ein Nitrozelluloseblatt
der Größe 8,3 cm x 5,9 cm)
10 ml AP-Puffer
66 µl NBT
33 µl BCIP

Alkalische Phosphatase (AP) Puffer

100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
100 mM Tris pH 9,5
ad 100 ml H₂O

BCIP Reagenz

(5-Bromo-4chloro-3indolyl-phosphat)

0,5 g BCIP
10 ml 70 % w/v
N,N-Dimethyl-formamid

Blockpuffer

5 g Milchpulver
ad 100 ml 1 x TBST

BSA-PBS-Blockpuffer

3 % w/v BSA
5 % w/v Milchpulver
ad 1 l 1 x PBS

Coomassie-Färbelösung

0,25 g Coomassie Brilliant Blue
45 ml Methanol
45 ml Aqua bidest.
10 ml Eisessig

Destain-Lösung

45 ml Methanol
45 ml H₂O
10 ml Eisessig

Elektrophorese-Puffer

0,025 M	Tris
0,192 M	Glycin
0,1 %	SDS (= Dodecylsulfat-Pulver)
ad 4 l	H ₂ O

Formalin 2 %

2 g	Formalin
90 ml	H ₂ O
	Titration bis Aufklaren der Lösung NaOH
10 ml	10 x PBS
	Titration auf pH 7,4 25 % (v/v) HCl

Laemmli (SDS-Gel-Loading) Puffer (verschiedene Konzentrationen)

für 3 x Laemmli Puffer	
0,6 g	SDS
0,46 g	DTT-Pulver
3 ml	H ₂ O
3 ml	0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8)
3 ml	Glycerol 87%
100 µl	Bromphenolblau 10%
(Zur Herstellung von 1 x Laemmli H ₂ O im Verhältnis 2:1 zu 3 x Laemmli geben. Vor Gebrauch zu 97 µl 1 x Laemmli 3 µl β-Mercaptoethanol (13,3 M) hinzu- geben)	

NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium) Reagenz

0,5 g	NBT
10 ml	70 % w/v N,N-Dime-thylformamid

PBS (verschiedene Konzentrationen)

für 1 x PBS	
137 mM	NaCl
2,683 mM	KCl
7,348 mM	Na ₂ HPO ₄
1,739 mM	KH ₂ PO ₄
ad 1 l	H ₂ O

Ponceau S Färbelösung (verschiedene Konzentrationen)

für 1 x Ponceau S Färbelösung	
0,2 g	Ponceau S
3 g	Trichloressigsäure
3 g	Sulfosalicylsäure
ad 100 ml	H ₂ O

Preserving-Lösung

25 ml Glycerin
225 ml H₂O

Stop-Lösung

200 µl 0,5 M EDTA (Chelator)
50 ml PBS

10 x Suspension-Puffer

200 µl 5 M NaCl
100 µl 1 M Tris-Cl pH 7,6
20 µl 0,5 M EDTA pH 8
680 µl H₂O

1 x TBST

(1 x TBS enthält kein Tween 20)
50 mM Tris pH 8,0
150 mM NaCl
0,05 % Tween 20
ad 1 l H₂O

1 x Towbin-Puffer (= Blot-Puffer)

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol
0,037 % w/v SDS
ad 1 l H₂O

1,0 M Tris pH 6,8

121,1 g Tris
800 ml H₂O
Titration auf pH 6,8 HCl
ad 1 l H₂O

1,5 M Tris pH 8,8

181,65 g Tris
800 ml H₂O
Titration auf pH 8,8 HCl
ad 1 l H₂O

Tyrode-Stammpuffer

0,2 g CaCl₂
0,2 g KCl
0,05 g NaH₂PO₄
0,2 g MgCl₂·6H₂O
8 g NaCl
1 g NaHCO₃
1 g Glucose
ad 1 l H₂O

2.4 Patientenseren, Ejakulate

Die 57 Patientenseren stammen von männlichen Sterilitätspatienten mit Entzündungszeichen im Genitaltrakt der andrologischen Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn, welche freundlicherweise von Prof. Dr. G. Haidl zur Verfügung gestellt wurden.

Weitere 8 Spenderseren mit nachgewiesener Fruchtbarkeit dienen als Kontrolle.

Es erfolgt eine Vortestung der Seren mittels ELISA gegen Antispermienantikörper (Cat. No./Kat. Nr.: 4460/4496). Eine Na-acid Konzentration von 0,1 % wird in ihnen zur Konservierung angestrebt. Die Seren werden bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Aus der IVF-Sprechstunde des Zentrums für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Rheinischen Friederich-Wilhelms-Universität Bonn stammen die Ejakulate mit frischen, nativen menschlichen Spermien für die Immunfluoreszenz, den Immunobeadassay und die Spermienpräparate.

Der Umgang mit den Patientenseren und –daten erfolgt nach den Richtlinien der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983).

2.5 Gewebeproben

Die menschlichen Hodenproben entstammen Hodenbiopsien der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie (Hodenresektion über Spermiogenese) und der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie (Hodentumorresektion) der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Die Mäusenieren und –hoden stammen von Tieren, die artgerecht in Käfigen der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gehalten und mittels cervicaler Dislokation getötet werden. Die Genehmigungsnummer hierzu lautet K 32197-2737/3203.

3. Methoden

3.1 SDS-PAGE und Westernblot

3.1.1 Prinzip des gekoppelten Verfahrens

Mithilfe der SDS-PAGE werden Proteinproben nach ihrem Molekulargewicht derart aufgetrennt, dass die negativ geladenen Proteine durch das 12 %ige Polyacrylamidgel in Richtung positiver Elektrode wandern. Dabei gelangen niedrigmolekulare Proteine schneller zur Kathode, so dass eine Laufbande entsteht, bei der sie entsprechend ihres Molekulargewichtes von den anderen Größen getrennt sind. Gleichzeitig mit den vier Proteinproben wird ein Marker aufgetrennt, welcher der Molekulargewichtsbestimmung dient. Die Proteinproben fungieren später gegenüber den Patientenseren als Antigene. Hierfür wird ein direkter Transfer der Proteinfractionen mithilfe des Semi-Dry-Westernblot-Verfahrens (Elektronentransfer) auf Nitrozellulosemembran hergestellt. Die übertragenen Proteinproben werden, nach einem Blockvorgang, mit dem zu untersuchenden Patientenserum (1. Antikörper = 1. AK) zur Reaktion gebracht. Nach einem Waschvorgang können an Proteinproben gebundene 1. AK mit einem sekundärem AK (= 2. AK), welcher gegen menschliches IgG gerichtet ist, erfasst und mittels einem Färbeverfahren sichtbar gemacht werden. Soweit nicht speziell vermerkt, erfolgen alle Schritte bei Raumtemperatur.

Dieses Verfahren wird dazu benutzt, bestimmte, an antigene Strukturen des männlichen Reproduktionstraktes bindende, Serum IgG Antikörper zu erfassen.

3.1.2 Herstellung der Gewebeeextrakte für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

3.1.2.1 Aufbereitung der Organe Hoden und Niere

Die Aufbereitung zur Extraktform erfolgt bei allen Gewebetypen (menschlicher Hoden, Mäusehoden, Mäuseniere) auf die gleiche Weise.

3.1.2.1.1 Gewebszerkleinerung

In einem SDS gereinigtem und mit Ethanol ausgespültem, vorgekühlten Mörser wird jeweils ein mit flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Gewebestück vorsichtig möglichst fein zerdrückt. Das feine Material wird in ein gekühltes Eppendorf-Tube überführt und nochmals mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.1.2.1.2 Aufbrechen der Proteine

Dem Gewebe wird im Verhältnis 1:5 ein Suspension-Puffer-Proteinaseinhibitorcocktail-Gemisch hinzugegeben. Bei z. B. 50 µl Gewebe wird 240 µl H₂O, 30 µl 10 x Suspension-Puffer und 30 µl 10 x Proteinaseinhibitorcocktail gemischt und 250 µl dieser Suspension dem Gewebe hinzugefügt. Dann erfolgt ein dreimaliges Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff, darauffolgendem Auftauen und Mischen, um die Gewebsmembranen aufzubrechen.

3.1.2.1.3 Aufbereitung mit Laemmli-Lösung

Der Gewebesuspension wird das halbe Volumen (= 150 µl) 3 x Laemmli-Lösung (mit β-Mercaptoethanol versetzt) zugegeben. Anschließend wird die Suspension für 10 min. bei 95°C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird sie bei 13000 rpm 10 min.

zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wird er für 10 min. bei 95°C im Wasserbad aufgekocht.

3.1.2.2 Aufbereitung der Spermien

3.1.2.2.1 Waschen der Spermien

Die aus der IVF-Sprechstunde stammenden, mit Kulturmedium versetzten Spermien werden mit dem neunfachen Volumen an PBS gewaschen. Nach dem Mischen erfolgt ein 4-minütiges Zentrifugieren bei 4000 rpm. Der Überstand wird daraufhin verworfen.

3.1.2.2.2 Aufbrechen der Proteine

Ein dem Überstand entsprechendes Volumen (200 μl) an Suspension-Puffer wird zum Pellet hinzugegeben und mehrmals über eine Kanüle geschert. Zu diesem wird 100 μl 3 x Laemmli-Lösung hinzugefügt und gemischt. Um die Proteine nun aufzubrechen, erfolgt ein dreimaliges Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff, Auftauen und Mischen. Danach wird die Suspension für 10 min. bei 95°C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgt ein 10-minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm bis die Probe vollkommen an Viskosität verloren hat. Die Lagerung erfolgt bei -20°C .

3.1.2.3 SDS-PAGE

Nach Gewinnung und Konzentrierung der jeweiligen Proteinextrakte wird die Proteinbestimmung nach Lowry (1951) durchgeführt, wobei eine Endmasse von 15 μg Protein pro Geltasche und Bahn angestrebt wird.

Die genaue Durchführung der Gelelektrophorese wird unter 4.1.3 erläutert.

3.1.2.4 Coomassie-Färbung

Das bei der Gelelektrophorese erhaltene Trenngel wird in eine Petrischale gelegt und 45 min. lang unter Schütteln mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Danach wird die Lösung abgeschüttet und das Gel wird alle 10 min. mit Destain-Lösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar werden. Nun kann die erforderliche Konzentration für die jeweilige Proteinfraction am Bandenmuster bestimmt werden. Zur Aufbewahrung wird das Gel in Preserving-Lösung gelegt und luftdicht abgeschlossen.

3.1.3 Erstellen des 12 % SDS-Polyacrylamidgels

Das 1971 von Laemmli entwickelte diskontinuierliche Laemmli-Gel eignet sich zur Auftrennung der behandelten Proteine und Peptide besonders gut, weil es die aufgetragenen Fraktionen zunächst gemäß der Prinzipien der Isotachophorese nach Nettoladung im Sammelgel trennt und konzentriert. Die eigentliche elektrophoretische Auftrennung nach Größe der Moleküle erfolgt erst nach dem Übergang der Proteine ins Trenngel.

3.1.3.1 Das Trenngel (= Laufgel)

3.1.3.1.1 Zusammensetzen der Kammer

Die Kammer, in der die beiden Gelkomponenten hintereinander zum Gesamtgel polymerisieren, besteht aus einer 10 cm x 8 cm großen Aluminium-Keramikplatte und einer exakt korrespondierenden Glasplatte. Durch zwei 0,75 mm dicke Spacer an den Seiten getrennt, werden die mit Ethanol gereinigten Platten aufeinander gelegt. Dieses sogenannte Sandwich wird durch die clamp assembly zusammengehalten und so mit Glasplatte nach vorne in den Dual Gel Caster, Mighty Small SE 245 eingespannt. Ein Taschenkamm wird zwischen die Platten eingeführt und an der Unterseite des Kamms sowie auch 5 mm darunter wird mit einem Permanent Marker eine Kennzeichnung gesetzt. Daraufhin wird der Kamm wieder entfernt.

3.1.3.1.2 Trenngel (= Laufgel) pipettieren

Pipettierschema für 12 %iges Laufgel

(für üblicherweise zwei Gele)

3,3 ml	H ₂ O
4,0 ml	Acrylamid-Mix 30 %
2,5 ml	1,5 M Trispuffer pH 8,8
0,1 ml	SDS 10 %
0,1 ml	Ammoniumpersulfat (APS) 10 %
0,004 ml	TEMED

Die Komponenten werden nach Schema bis einschließlich APS in Einmalröhrchen pipettiert und gemischt, wobei darauf zu achten ist, dass das als Katalysator wirkende APS täglich frisch angesetzt wird. TEMED, die Initiatorsubstanz der Polymerisation, wird erst kurz vor dem Einfüllen des Gels in die Polymerisationskammer hinzugegeben, da die Polymerisation in diesem Moment einsetzt. Die Suspension wird bis 2 mm über der unteren Markierung mit einer Kanüle zwischen die Platten injiziert, wobei keine Luftblasen entstehen sollten. Um das Gel vollständig frei von dem als Radikalfänger wirkenden und die Polymerisation hemmenden O₂ frei zu halten und zusätzlich H₂O Entzug durch Verdunstung und daraus folgende Inhomogenitäten innerhalb des Gels zu minimieren, wird das Gel mit H₂O gesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach 45 min. ist das Gel vollständig polymerisiert.

3.1.3.2 Das Sammelgel

Da die beiden Gelkomponenten eine unterschiedliche Funktion innehaben, besteht auch ein Unterschied in der Zusammensetzung: Das Sammelgel beinhaltet eine geringere Acrylamidkonzentration und nähert sich im pH-Wert stärker dem Nullwert an, wodurch sich die Proteine leichter entsprechend ihrer natürlichen Ladung in diesem gröberporigen Medium sammeln können. Darüber hinaus wird die Polymerisationszeit durch die stark erhöhte TEMED-Konzentration wesentlich verkürzt.

Pipettierschema für 5 %iges Sammelgel

(für üblicherweise zwei Gele)

1,72 ml	H ₂ O
0,50 ml	Acrylamid-Mix 30 %
0,76 ml	0,5 M Trispuffer pH 6,8
0,03 ml	SDS 10 %
0,03 ml	Ammoniumpersulfat (APS) 10 %
0,003 ml	TEMED

Wenn das Trenngel vollständig polymerisiert ist, wird das n-Butanol abgegossen und die Oberfläche des Trenngels gründlich mit H₂O gespült. Dann wird das Sammelgel zügig auf das Trenngel aufgetragen. Ein mit Ethanol gereinigter 0,75 mm dicker Kamm, dessen Abdruck nach dem Polymerisationsvorgang die Geltaschen bildet, wird in das noch flüssige Sammelgel blasenfrei eingeführt. Die Polymerisationszeit beträgt ca. 15 min.

3.1.3.3 Vorbereiten der Proteinproben

Nach Gewinnung und Konzentrierung der einzelnen Proteinextrakte wird die Proteinbestimmung nach Lowry (1951) durchgeführt, wobei eine Endmasse von 15 µg Protein pro Geltasche und Bahn angestrebt wird. Die jeweiligen Proteinlösungen werden entsprechend dieser Vorgabe eingestellt und als Aliquots in 1,5 ml Einmalreaktionsgefäßen für 10 min. bei 95°C im Wasserbad aufgekocht. Um eine höhere Homogenität der aufzutragenden Proteinextrakte zu erlangen, werden die Proben daraufhin für 1 sec. bei 13000 rpm abzentrifugiert.

3.1.3.4 Auftragen der Proben in die Geltaschen

Wenn das Gel vollständig polymerisiert ist, werden die beiden „Sandwichs“ in die Gelelektrophoresekammer eingespannt. Dabei entstehen zwei Kammern, die jeweils mit ca. 100 ml 1 x Elektrophoresepuffer aufgefüllt werden. Bevor die Kämmen vorsichtig entfernt

werden, werden Schablonen entlang der Kämme justiert, um die für das bloße Auge nicht gut zu erkennenden Kammern nicht zu verfehlen. Vor dem Auftragen der Proben werden die Geltaschen mit 1 x Elektrophoresepuffer gespült, um alle Gelreste zu entfernen. In jede Tasche werden 10 µl Proteinproben in der Reihenfolge der Tabelle 3 injiziert:

Tab. 3: Injektionsschema der Proteinproben für die Gelelektrophorese

Kammer	Proteinprobe
1	SDS-PAGE-Standard-Marker M
2	Niere von Maus NiM
3	Hoden von Maus HoM
4	Hoden von Mensch HoH
5	Spermien von Mensch SpH
6	Niere von Maus NiM
7	Hoden von Maus HoM
8	Hoden von Mensch HoH
9	Spermien von Mensch SpH
10	SDS-PAGE-Standard-Marker M

3.1.3.5 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine

Da die beiden Gelkomponenten von verschiedener Substanz sind, muss das Spannungsfeld auch jeweils den Komponenten angepasst werden. Dafür wird am Netzgerät ein Menü gewählt, welches stromstärkegesteuert zunächst 10 min. lang für das Sammelgel 20 mA (10 mA für jedes Gel), dann 60 min. lang für das Trenngel und den Auftrennungsprozess 30 mA (15 mA für jedes Gel) aufrechterhält. Bei beiden Prozessen sind die restlichen Einstellungen einheitlich bei 500 V, 100 W und 100000 Vh.

3.1.4 Blotten

Der Transfer von großen, durch die Gelelektrophorese aufgetrennten, Molekülen auf einen immobilisierenden Filter wird Blotten genannt. 1975 wurde dieses Verfahren zum ersten Mal von Southern beschrieben, dem ein DNA-Transfer von Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran gelang. Später wurde das Westernblot Verfahren zum Nachweis von Proteinen eingeführt. Um Proteine aus Polyacrylamidgelen zu transferieren, veränderte Towbin (1979) die elektrischen Parameter. 1984 entwickelte Kyhse-Andersen das hier verwendete Semi-Dry-Blotting.

3.1.4.1 Vorarbeiten

Beim Semi-Dry-Blotting wird ein „Sandwich“ in horizontaler Ausrichtung, bestehend aus Towbin-Puffer getränktem Whatman-Papier und sich dazwischen befindendem Polyacrylamidgel und Nitrozellulosemembran, gebildet. In der Blotting Zelle ergibt sich daraus von oben nach unten folgende funktionelle Reihenfolge:

Kathode
2 Lagen Whatman-Papier I
Laufgel
Nitrozellulosemembran
2 Lagen Whatman-Papier II
Anode

Dadurch, dass die Elektroden nur durch diese wenige Millimeter dicke Schicht getrennt sind, ergibt sich eine hohe Feldstärke und damit ein schneller Transfer. Um keine Kurzschlüsse zwischen den einzelnen Schichten durch Überlappungen von oben zu bekommen, empfiehlt sich ein von oben nach unten um ca. 1 mm zunehmender Überlappungssaum pro Schicht, wobei die Größe des Laufgels den Bezugsrahmen bildet.

Nach Abschluss des elektrophoretischen Auftrennungsprozesses wird das Sammelgel vom Laufgel abgetrennt. Sowohl das Laufgel als auch die Nitrozellulosemembran und

das Whatman-Papier werden für 5 min. in Towbin-Puffer (= Blot-Puffer) äquiliibriert, bevor sie ins Sandwich eingebaut werden. Beim Einbau ist darauf zu achten, dass jede einzelne Komponente luftblasenfrei mit einer Walze ausgewalzt wird, um ein homogenes elektrisches Feld zu erlangen, was den vollständigen Transfer einleitet.

3.1.4.2 Blotten der Gele

Es wird ein Menü am Netzgerät gewählt, das spannungsgesteuert eine Obergrenze von 15 V einhält für Blots der Größe 8,2 cm x 5,8 cm. Ein optimaler Transfer der Proteine vom Laufgel auf die Nitrozellulosemembran ist gewährleistet, wenn die Spannung möglichst nahe an die im Programm vorgesehenen 15 V herankommt. Hält sich die Spannung kontinuierlich unter 10 V, so ist das „Sandwich“ suboptimal. Bei einer Transferzeit von 30 min. betragen die restlichen Einstellungen 250 mA, 2 W und 1000 Vh.

3.1.4.3 Färben der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S

Die allgemeine Proteinfärbung mit 1 x Ponceau S dient einerseits der Kontrolle des Transfers, weil mit ihr die Vollständigkeit, Homogenität und Quantität des Vorgangs abgeschätzt werden kann, andererseits können durch sie die als Größenstandard wirkenden Markerbanden mit einem permanent Marker auf der Nitrozellulosemembran gekennzeichnet werden, während der Farbstoff selbst im weiteren Vorgehen wieder ausgewaschen wird.

Nach dem Blotten wird die Nitrozellulosemembran unter Schütteln in 10 % Ponceau S-Färbelösung 5-10 min lang gefärbt. Die Membran wird dann mit H₂O vorsichtig bis auf die Proteinbanden entfärbt. Nach Kennzeichnung der Markerbanden und Einschätzung der Qualität des Gellaufs und des Westernblots wird die Membran in der Mitte zwischen Spermien- und Nierenbande durchgeschnitten, so dass für die Antikörperinkubation mit einem Gel zwei Seren getestet werden können.

3.1.4.4 Blocken der unspezifischen Bindungsstellen

Um die freien Bindungsstellen, die durch den Blotvorgang auf der Nitrozellulosemembran entstanden sind, vor unspezifischer Bindung abzuschirmen, wird 1-2 Stunden lang mit Milcheiweiß geblockt. Dafür werden die Nitrozellulosemembranen Rücken an Rücken liegend in einem Blockpufferbad geschwenkt.

3.1.4.5 Inkubation mit primärem Antikörper (1. AK)

Für die Inkubation der Blots werden die Patientenserum im Verhältnis 1:100 mit Blockpuffer verdünnt. Dazu werden pro Nitrozellulosemembran 24 µl Serum mit 2376 µl gekühltem Blockpuffer gemischt. Die Membran wird zusammen mit dieser Suspension unter Ausschluss von Luftblasen eingeschweißt und bis zu 14 Stunden, wenigstens aber 4 Stunden lang geschüttelt.

Nach Inkubation wird die entnommene Nitrozellulosemembran 4-6 Mal je mindestens für 5 min. in 1 x TBST unter Schütteln gewaschen.

3.1.4.6 Inkubation mit sekundärem Antikörper (2. AK)

Für die sekundäre Inkubation der Blots wird Anti-Human-IgG-alkalische-Phosphatase-Konjugat im Verhältnis 1:1000 mit Blockpuffer verdünnt, wofür pro Nitrozellulosemembran 5 µl Anti-Human-IgG mit 4995 µl Puffer gemischt wird. Je zwei Membranen werden Rücken an Rücken zusammen mit diesem Gemisch unter Ausschluss von Luft eingeschweißt und mindestens 1 Stunde lang geschüttelt.

Nach erfolgter Inkubation werden die Nitrozellulosemembranen aus der Folie entnommen und 4-6 Mal für je 5 min. in 1 x TBST (pH-neutral) unter Schütteln gewaschen.

Daraufhin werden die Membranen zur pH-Wert Anpassung mindestens 5 min. lang in Alkalische Phosphatase-Puffer (pH 9,5) äquilibriert.

3.1.4.7 Alkalische Phosphatase Färbung

Die Nitrozellulosemembranen werden mit der kurz vorher angesetzten AP-Färbelösung, die homogen sein sollte, da die Färbung sonst Flecken aufweisen könnte, unter Lichtausschluss 10-30 min. (je nach entsprechender Farbentwicklung) gefärbt. Mithilfe der Stop-Lösung, die 5 min. einwirken sollte, wird die Färbereaktion unterbrochen. Daraufhin werden die Membranen kurz mit H₂O abgewaschen und an der Luft getrocknet. Zur Aufbewahrung unter Lichtausschluss werden die Nitrozellulosemembranen zwischen zwei Filterpapieren gelegt. Für das Protokoll wird die Färbezeit notiert (zwischen 7 und 40 min.).

3.2 Immunfluoreszenz

Der hier verwendete indirekte mikroskopische Immunfluoreszenztest ermöglicht eine zusätzliche Charakterisierung der Antikörper gegen Antigene des reproduktiven Traktes (ARA) neben den Ergebnissen des Westernblot.

Hierfür werden auf einem Objektträger fixierte Spermatozoen mit Patientenserum (1. AK) überschichtet und inkubiert. Nach einem Waschvorgang werden gegen menschliches IgG gerichtete Antikörper (2. AK) aufgetragen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden können. Falls die 2. AK in einem weiteren Waschvorgang nicht entfernt werden können, weil sie sich an die 1. AK gebunden haben, die ihrerseits eine Bindung mit Spermienstrukturen eingegangen sind, kann man mikroskopisch an diesen Stellen ein Fluoreszieren beobachten.

3.2.1 Erstellen und Färben der humanen Spermienpräparate

Das frisch erhaltene Ejakulat wird einmal in 1 x PBS gewaschen und bei 600 g für 10 min. abzentrifugiert.

3.2.1.1 Fixierung

Das Pellet wird in 1 ml 2 %igem Formalin für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch werden die Spermien fixiert. Danach erfolgt ein dreimaliger 1 x PBS-Waschvorgang: Jeweils 10 min. lang werden die Spermien bei 4000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wird der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 1 x PBS resuspendiert, wobei sich die letzte Resuspension in ihrem Volumen der Anzahl der zu erstellenden Präparate anpasst (20 µl Spermien suspension pro Objektträger).

3.2.1.2 Triton X-Bad

Die Objektträger werden mit Methanol : Chloroform : Aceton / 1 : 1 : 1 gereinigt. Zur adhäsiven Immobilisation der Spermatozoen werden die Objektträger in ein Polylysinbad (0,1 % Poly-L-Lysin in H₂O) überführt. Nach Lufttrocknen der Objektträger werden jeweils 10 µl Spermatozoensuspension darauf aufgetragen, mit einer Pipettenspitze ausgestrichen und luftgetrocknet. Die Auftragsstelle wird auf der Rückseite des Objektträgers gekennzeichnet. Es folgt eine 10 min. Überschichtung mit 200 µl 0,5 %igem Triton X, wobei darauf zu achten ist, dass die Spermatozoen nicht weggeschwemmt werden.

3.2.1.3 Inkubation mit primärem Antikörper (1. AK)

Die Triton X-Überschichtung wird abgegossen. Daraufhin werden 20 µl mit 3 %igem BSA-PBS-Blockpuffer verdünntes Patientenserum in einer Verdünnung 1 : 25 auf die

ausgestrichenen Spermatozoen gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und für eine Stunde in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Abwaschen des Deckglases mit PBS erfolgt ein viermaliger Waschgang der Objektträger mit PBS in einer Küvette.

3.2.1.4 Inkubation mit sekundärem Antikörper (2. AK)

0,3 µl Anti-Human-IgG-FITC Konjugate wird in 20 µl 3 %igem BSA-PBS-Blockpuffer im Verhältnis 1 : 67 verdünnt auf die getrockneten Objektträger gegeben und blasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt. Es erfolgt eine einstündige Inkubation in der feuchten Kammer. Nach Abwaschen des Deckglases mit PBS wird der Objektträger zweimal für je 10 min. in einer Küvette mit PBS gewaschen.

3.2.1.5 Hoechst Bis-Benzimid 33342 Färbung

In eine 50 ml PBS enthaltende Küvette, in der sich der Objektträger befindet, wird 50 µl Hoechst Bis-Benzimid 33342 gegeben. Nach 10 minütiger Färbung wird der Objektträger für 10 min. in der Küvette mit PBS gewaschen.

3.2.1.6 Versiegelung der Objektträger (OT)

Zur Bewahrung der Fluoreszenzleistung werden die getrockneten OT mit einem Tropfen Vectashield pro Deckglas versehen. Die Objektträger werden unter Lichtausschluss aufbewahrt und am selben, spätestens am darauffolgenden Tag, ausgewertet.

3.2.1.7 Mikroskopische Betrachtung

Die Spermatozoen werden unter Verwendung des 100er Objektivs mit dem Fluoreszenzmikroskop und im Vergleich mit dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet (siehe Abbildung 3).

3.3 Indirekter Immunobeadassay

Die verwendeten Immunobeadkugeln sind mit aus Kaninchen hergestellten Antikörpern gegen humane Antikörper (2. AK) beschichtet. Wenn im Patientenserum Antikörper gegen native Spermatozoenstrukturen (1. AK) vorhanden sind, können die 2. AK an native Spermien binden. Die AK-Kugeln-Komplexe sind so groß, dass man sie unter dem Mikroskop leicht neben den Spermien erfassen kann.

Der indirekte Immunobeadtest ergänzt die Ergebnisse des Westernblot und der Immunfluoreszenz.

3.3.1 Vorbereitung der Reagenzien

Für Puffer I wird 0,3 g BSA (Cohn Fraktion V) abgewogen und auf 100 ml Tyrode-Stammpuffer aufgefüllt.

Für Puffer II wird 5,0 g BSA (Cohn Fraktion V) abgewogen und auf 100 ml Tyrode-Stammpuffer aufgefüllt.

Alle Puffer werden mit 0,22 µm Millipore filtriert und vor Gebrauch auf 25-35 °C im Wasserbad erwärmt. Das Immunobead Rabbit Anti-Human Ig(H+L) Reagent wird folgendermaßen hergestellt: Das Lyophilisat wird in 2 ml H₂O gelöst. Hieraus werden 0,2 ml entnommen und mit Puffer I einmal gewaschen. Danach wird 4 min. lang bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Beads werden vorsichtig in Puffer II aufgenommen. Es entsteht ca. 1 ml gebrauchsfertige Lösung.

3.3.2 Herstellung der Spermisuspension

Gut bewegliche Spermien (optimal ist eine Spermienpräparation, wie sie für die in vitro Fertilisation gebräuchlich ist) werden jeweils zweimal mit Puffer I gewaschen und 4 min. lang bei 4000 rpm zentrifugiert. Dabei ist darauf zu achten, dass sofort nach Stillstand der Zentrifuge der Überstand abgekippt wird, da die beweglichen Spermien sonst aus dem Pellet entweichen könnten. Das Pellet wird in soviel Puffer II gelöst, bis eine Endkonzentration von 50 Millionen Spermien/ml erreicht ist.

3.3.3 Inkubation mit primärem Antikörper (1. AK)

In ein Eppendorftube werden 10 µl Patientenserum, 40 µl Puffer II und 50 µl Spermisuspension gegeben, gemischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird die Suspension jeweils zweimal in 1000 µl Puffer I gewaschen und für 4 min. bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird dann in 100 µl Puffer II gelöst.

3.3.4 Inkubation mit sekundärem Antikörper (2. AK)

5 µl Spermisuspension und 5 µl gut gemischte Immunobeadsuspension werden auf einen Objektträger gegeben, mit der Pipettenspitze miteinander vermischt, mit einem Deckglas abgedeckt und für 10 min. in der feuchten Kammer inkubiert.

3.3.5 Mikroskopische Betrachtung

Die Spermien werden bei 400facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt: Der prozentuale Anteil der beweglichen Spermien, an denen zwei oder mehr Immunobeads haften, wird bestimmt, nachdem 20 Gesichtsfelder ausgezählt wurden. Dabei wird die Bindung an Schwanzspitzen nicht als klinisch signifikant angesehen. Der

Test gilt als positiv, wenn mindestens 50 % motile Spermatozoen an Immunobeads haften (siehe Abbildung 4).

4. Statistische Auswertung

Die Abhängigkeiten der Daten wurden für die statistische Auswertung aufgrund des relativ kleinen Patientenkollektivs mit dem exakten Test von Fisher, einer Sonderform des χ^2 -Tests, mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel von Microsoft in Windows XP errechnet.

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Außer der Gemeinsamkeit der Entzündungszeichen im Genitaltrakt war das Patientenkollektiv anamnestisch sehr inhomogen (siehe Tabelle 10).

5.1.1 Anamnestische und klinische Daten

10 der 57 Männer (17,54 %) waren jünger als 31 Jahre. 24 Patienten (42,11 %) waren 31 Jahre bis 35 Jahre alt. 14 Seren (24,56 %) stammten von Sechsdreißig- bis Vierzigjährigen. 9 Proben (15,79 %) wurden von über Vierzigjährigen entnommen.

Die Patienten hatten zum Teil Kinderwunsch seit bis zu 20 Jahren, 4 von ihnen (7,02 %) gaben an, ein oder mehrere eigene Kinder zu haben. Bei 29 Männern (50,88 %) wurde schon mal mindestens eine Varicocele diagnostiziert, bei einem von ihnen (1,75 %) mit Begleithydrocele. Eine Lageanomalie konnte bei 14 der Getesteten (24,56 %) erfragt werden. Bei einem Mann (1,75 %) war eine celenartige Absetzung im Mittelstück des rechten Nebenhodens bekannt, bei einem anderen (1,75 %) eine leichte diffuse tubuläre

Hodenatrophie beidseits, die mit Hormonen behandelt wurde, bei einem weiteren (1,75 %) eine Hodenatrophie bei Zustand nach Hodentorsion. Bei einem Mann (1,75 %) war eine benigne Prostatahyperplasie bekannt. Bei 2 Patienten (3,51 %) konnte eine Hodentorsion eruiert werden, bei einem (1,75 %) eine Hodenprellung. Bei einem der Männer (1,75 %) war ein OAT-Syndrom (Oligoasthenoteratozoospermie-Syndrom) bekannt, bei einem weiteren (1,75 %) eine Einschränkung der Spermatogenese, ebenfalls bei einem (1,75 %) ein hypergonadotroper Hypogonadismus, bei einem anderen (1,75 %) ein schwerer Testisschaden mit Spermatogenesestop und Übergang in ein Depopulationssyndrom. Ein Mann (1,75 %) litt an einer rezidivierenden Prostatitis, einer (1,75 %) hatte eine Prostatitis, ein anderer (1,75 %) litt als Kind an einer schweren Nierenentzündung, einer (1,75 %) hatte anamnestisch bekannte pathologisch erhöhte FSH-Spiegel. Mumps in der Vergangenheit hatten 12 der Patienten (21,05 %). Eine stattgehabte Gonorrhoe gab ein Patient (1,75 %) an. Ebenfalls bei einem Patienten (1,75 %) war Hepatitis A bekannt, ein weiterer (1,75 %) hatte eine Hepatitis A- und B-Infektion durchgemacht. Eine Circumcision in der Kindheit wurde bei 3 Patienten (5,26 %) vorgenommen. Regelmäßigen (beruflichen) Kontakt mit Chemikalien und Lösungsmitteln hatten 4 der Männer (7,02 %). Nikotinkonsum gaben 6 der Männer (10,53 %) an.

Eine Insemination hatten 6 Patienten (10,53 %), eine IVF-Behandlung 7 Patienten (12,28 %), eine ICSI-Behandlung 6 Patienten (10,53 %) hinter sich. Eine Padutin-Behandlung hatten 4 Männer (7,02 %) in der Vergangenheit gehabt, eine Tamoxifen-Behandlung einer (1,75 %), eine HCG/HMG-Behandlung hatte ein Patient (1,75 %) hinter sich, eine Behandlung mit Zink einer (1,75 %), eine Behandlung mit Vitamin E ebenfalls einer (1,75 %).

5.1.2 Auswertung der Spermioграмme

Alle getesteten Patienten wiesen ein auffälliges Spermioграмm (siehe Tabellen 11 und 12) auf, wobei die Auffälligkeiten differierten. 5 Patienten (8,77 %) hatten ein erniedrigtes Ejakulatvolumen. Eine Probe (1,75 %) wies einen erhöhten pH-Wert auf. Bei 56 Männern (98,25 %) war die Motilität der Spermien nicht ausreichend. 36 Patienten

(63,16 %) hatten eine zu geringe Spermienanzahl. 53 Proben (92,98 %) wiesen nicht genügend Spermien mit einer normalen Morphologie auf. 25 von 53 Männern (47,17 %) hatten erhöhte Leukozytenwerte. Die verminderte Patientenzahl bei diesem Parameter und auch den folgenden erklärt sich durch mangelnde Compliance der Patienten. Bei 19 von 44 Proben (43,18 %) war die Agglutination erhöht. Bei 5 von 44 Männern (11,36 %) fanden sich Makrophagen. 12 von 55 Patienten (21,82 %) wiesen erniedrigte Eosin-Vitalwerte auf.

5.1.3 Auswertung weiterer Parameter

4 von 55 Patienten (7,27 %) wurden, wie in Tabelle 13 dargestellt, mittels ELISA positiv auf Chlamydien IgA getestet. 10 von 56 Seren (17,86 %) wiesen, ermittelt durch ELISA, erhöhte Serumantikörperwerte auf. Bei 9 von 56 Männern (16,07 %) wurden mittels ELISA erhöhte Interleukin 6-Werte gemessen. Ein Patient aus dem Gesamtkollektiv (1,75 %) hatte erhöhte Prolaktin-Werte, ein anderer Patient aus dem Gesamtkollektiv (1,75 %) hatte erniedrigte Prolaktin-Werte. 20 von 53 Seren (37,74 %) wiesen erniedrigte Inhibin-Werte auf.

Die Ergebnisse der Mikrobiologie der Ejakulate (siehe Tabelle 14) differierten ebenfalls voneinander. 7 der Patienten (12,28 %) hatten kein aerobes Wachstum im Ejakulat. Kolonien mit koagulase-negativen Staphylokokken konnten in 24 Proben (42,11 %) angezüchtet werden. Bei zwei Männern (3,51 %) fanden sich Enterokokken. Bei einem Patienten (1,75 %) fanden sich Streptokokken ohne Gruppenantigennachweis, bei einem anderen (1,75 %) *Escherichia coli*, bei einem weiteren (1,75 %) gram-negative Stäbchen. Einmal (1,75 %) gab es Wachstum von Streptokokken der Gruppe B, einmal (1,75 %) von *Staphylokokkus aureus*. Vergrünende Streptokokken fanden sich in 5 der Proben (8,77 %). Koagulase-negative Staphylokokken und Enterokokken wurden bei zwei Männern (3,51 %) nachgewiesen. Bei zwei anderen Koagulase-negative Staphylokokken und vergrünende Streptokokken. Ebenfalls bei zweien (3,51 %) Koagulase-negative Staphylokokken und Streptokokken ohne Antigennachweis. Ein Mann (1,75 %) hatte Koagulase-negative Staphylokokken und *Escherichia coli* im Ejakulat. 3 Patienten (5,26

%) hatten ein Wachstum von Koagulase-negative Staphylokokken und Ureaplasma urealyticum. Eine Probe (1,75 %) wies Ureaplasma urealyticum und Neisseria gonorrhoeae auf. Urea-plasma urealyticum und vergrünende Streptokokken kamen einmal (1,75 %) vor. Bei einer Probe konnten vergrünende Streptokokken und Staphylokokkus aureus angezüchtet werden. Eine dreifache Keimbesiedelung mit Koagulase-negativen Staphylokokken, Ureaplasma urealyticum und Mykoplasma species war einmal (1,75 %) nachzuweisen.

5.1.4 Ergebnisse des Westernblot im Patientenkollektiv

56 der 57 Patientenseren (98,25 %) wiesen eine positive Reaktion im Westernblot mit humanen Hodenproteinen auf. 52 Seren (91,23 %) zeigten eine positive Reaktion mit humanen Spermien, 46 Seren (80,70 %) eine positive Reaktion mit humanen Spermien bei den als relevant gesehenen Banden. Alle 57 Patientenseren zeigten eine positive Reaktion mit Hodenproteinen der Maus, 45 Patientenseren (78,95 %) zeigten eine positive Reaktion mit Nierenproteinen der Maus. Die Kontrollseren zeigten keine positive Reaktion.

5.1.5 Ergebnisse der Immunfluoreszenz im Patientenkollektiv

Durch die Verwendung eines gegen menschliches IgG gerichteten Antikörpers (2. AK), der mit allen primären Antikörpern, die im Menschen produziert werden, reagiert, kann der indirekte Immunfluoreszenztest in der klinischen Praxis relativ flexibel und kostengünstig angewendet werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigten 20 Patienten (35,09 %) eine positive Reaktion bei der Immunfluoreszenz. Dabei wurde bei 17 Patienten (29,82 %) eine Fluoreszenz um den Spermischwanz, bei 2 Patienten (3,51 %) eine um den Spermienkopf und –schwanz und bei einem Patienten (1,75 %) eine um das Äquatoralsegment beobachtet (siehe Tabelle 16). Auch hier zeigten die Kontrollseren kein positives Ergebnis.

5.1.6 Ergebnisse des indirekten Immunobeadassays im Patientenkollektiv

3 der Seren (5,26 %) ergaben ein positives Ergebnis beim indirekten Immunobead-assay (siehe Tabelle 16), welcher in der Praxis der Diagnostik sehr häufig eingesetzt wird. Grundlage bildet eine Matrix, die mit IgG-spezifischen Antiglobulinen beschichtet ist, welche an Autoantikörper gegen Spermatozoen bindet. Spezifische Antigene lassen sich mit dieser Methode allerdings nicht identifizieren. Bei den Kontrollseren wurde keine positive Reaktion beobachtet.

5.2 Ergebnisse des Westernblot

Im Westernblot wurden aufgrund des Versuchsaufbaus eine große Anzahl Serum-IgG-Autoantikörper detektiert, die gegen die verschiedensten Antigene des männlichen Reproduktionsapparates gerichtet sind.

IgG-Moleküle liegen als Y-förmige Monomere vor, die klein genug sind, um aus dem Blut ins Gewebe und sogar durch die Plazenta oder die Blut-Hoden-Schranke zu diffundieren. Die Gruppe der IgG ist der häufigste Isotyp im Serum und in der Extrazellulärflüssigkeit. IgG ist fähig, Pathogene zu opsonieren, das Komplementsystem zu aktivieren und besitzt Agglutinationsfähigkeit. Ebenso können Autoantikörper aus IgG bestehen, wenn der Körper gegen eigene Körperbestandteile Antikörper bildet

In dieser Arbeit wurden die einzelnen gewebespezifischen Proteine aus menschlichen Spermien, menschlichem Hoden, Mäusehoden und Mäusenieren aufgetrennt und die Immunreaktionen jedes Antigens bestimmt. Mithilfe des mitgelaufenen Markers konnten die Proteine nach ihrem Molekulargewicht [kDa] unterschieden werden, während die Konzentration der untersuchten Eiweiße mit diesem biochemischen Verfahren nur relativ bestimmt werden konnte.

Nach optischer Einschätzung wurden die nach der Färbung aufgetretenen Banden, die die Antikörperantwort gegen das dort befindliche Protein darstellen, in sichtbar schwache Banden (1), in sichtbare (2) und in sehr deutliche Banden (3) eingeteilt (siehe Abbildung 1) und, orientiert am mitlaufendem Marker, nach ihrer Größe (kDa) in die Western-

blot-Urdatenblätter (siehe Anhang) und die Bandenmuster (siehe Anhang) übertragen und mit den Banden der anderen Gewebe verglichen.

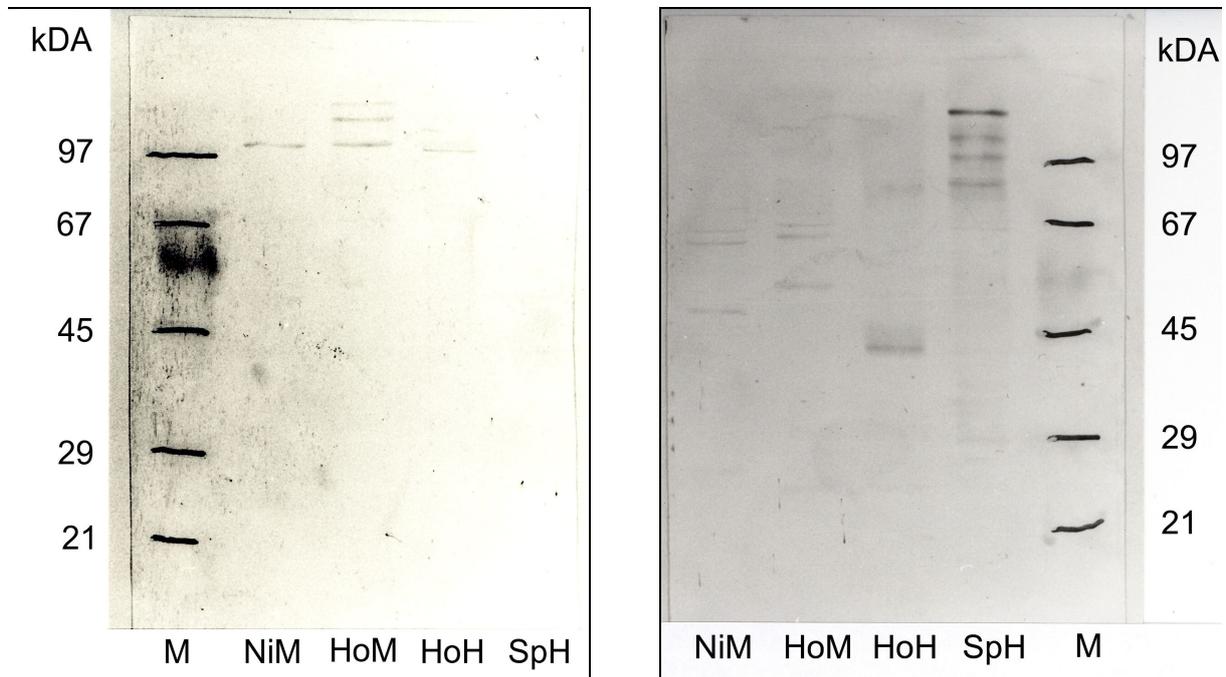


Abb. 1: Zwei Beispiele für Immunobeadassays mit sichtbar schwachen, sichtbaren und sehr deutlichen Banden

5.2.1 Relevante Banden

Als relevant wurden die folgenden Banden im Westernblot gesehen: 6, 8, 9 (= 97 kDa), 13, 17 (= 67 kDa), 22, 26, da diese entweder eine besondere Häufung der Antikörperreaktionen zeigten oder als relativ spezifisch für ein Gewebe angesehen werden konnten (siehe Tabelle 15).

Die genauen Definitionen der einzelnen Antikörperfraktionen werden in den Westernblot-Urdatenblättern 1a-4a und 1b-4b (siehe Anhang) angegeben, wobei die Banden der verschiedenen Gewebearten zur besseren Unterscheidung der Tabellen mit den Buchstaben a-d versehen wurden.

5.2.1.1 Reaktionen an Bande 6

Insgesamt 20 von 57 Patienten (35,09 %) zeigten eine Reaktion an der Bande 6 gegen humane Spermien. Bei 7 der Patienten (12,28 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 12 der Patienten (21,05 %) gab es zugleich eine Reaktion mit dem Hodengewebe der Maus, bei einem Patienten (1,75 %) eine Reaktion sowohl mit Hodengewebe der Maus als auch mit humanen Hodenproteinen.

4 Seren (7,02 %) reagierten an Bande 6 mit humanen Hodenproteinen. Bei einem (1,75 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgeweben. 2 (3,51 %) hatten eine parallele Bande in Hodengewebe der Maus, einer (1,75 %) in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien.

30 Patienten (52,63 %) wiesen eine Reaktion bei Bande 6 mit Hodenproteinen der Maus auf. Bei 15 (26,32 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 12 der Patienten (21,05 %) gab es zugleich eine Reaktion mit humanen Spermien, bei einem (1,75 %) eine mit humanem Hodengewebe, bei einem anderen (1,75 %) eine Reaktion mit humanem Hodengewebe und humanen Spermien.

2 Seren (3,51 %) hatten eine Reaktion an Bande 6 mit Nierenproteinen der Maus. Beide (3,51 %) hatten auch eine parallele Bande in Hodengewebe der Maus.

5.2.1.2 Reaktionen an Bande 8

Insgesamt 10 von 57 Patienten (17,54 %) zeigten eine Reaktion an der Bande 8 gegen humane Spermien. Bei 4 der Patienten (7,02 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei einem der Patienten (1,75 %) gab es zugleich eine Reaktion mit humanem Hodengewebe, bei 2 der Patienten (3,51 %) gab es auch eine Reaktion mit dem Hodengewebe der Maus, bei 3 Patienten (5,26 %) eine Reaktion sowohl mit Hodengewebe der Maus als auch mit humanen Hodenproteinen.

10 Seren (17,54 %) reagierten an Bande 8 mit humanen Hodenproteinen. Bei einem (1,75 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgeweben, bei einem (1,75 %) gab es auch eine Reaktion mit humanen Spermien. 5 (8,77 %) hatten eine parallele

Bande in Hodengewebe der Maus, 3 (5,26 %) in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien.

16 Patienten (28,07 %) wiesen eine Reaktion bei Bande 8 mit Hodenproteinen der Maus auf. Bei 6 (10,53 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 2 der Patienten (3,51 %) gab es zugleich eine Reaktion mit humanen Spermien, bei 5 (8,77 %) eine mit humanem Hodengewebe, bei 3 (5,26 %) eine Reaktion mit humanem Hodengewebe und humanen Spermien.

3 Seren (5,26 %) hatten eine Reaktion an Bande 8 mit Nierenproteinen der Maus. Alle 3 (5,26 %) hatten auch eine parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanem Hodengewebe.

5.2.1.3 Reaktionen an Bande 9 (= 97 kDa)

Insgesamt 27 von 57 Patienten (47,37 %) zeigten eine Reaktion an der Bande 9 gegen humane Spermien. Bei 2 der Patienten (3,51 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 6 der Patienten (10,53 %) gab es zugleich eine Reaktion mit humanem Hodengewebe, bei 1 der Patienten (1,75 %) gab es auch eine Reaktion mit dem Hodengewebe der Maus, bei 18 Patienten (31,58 %) eine Reaktion sowohl mit Hodengewebe der Maus als auch mit humanen Hodenproteinen.

43 Seren (75,44 %) reagierten an Bande 9 mit humanen Hodenproteinen. Bei 4 (7,02 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgeweben, bei 6 der Patienten (10,53 %) gab es auch eine Reaktion mit humanen Spermien. 15 (26,32 %) hatten eine parallele Bande in Hodengewebe der Maus, 18 Patienten (31,58 %) in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien.

38 Patienten (66,67 %) wiesen eine Reaktion bei Bande 9 mit Hodenproteinen der Maus auf. Bei 4 (7,02 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei einem der Patienten (1,75 %) gab es zugleich eine Reaktion mit humanen Spermien, bei 15 (26,32 %) eine mit humanem Hodengewebe, bei 18 Patienten (31,58 %) eine Reaktion mit humanem Hodengewebe und humanen Spermien.

25 Seren (43,86 %) hatten eine Reaktion an Bande 9 mit Nierenproteinen der Maus. Bei einem Patienten (1,75 %) gab es keine parallele Bande in den anderen Gewebearten.

Bei 2 (3,51 %) gab es eine Reaktion auch mit Hodengewebe der Maus, bei einem (1,75 %) mit humanen Spermien. Bei 2 (3,51 %) gab es eine Reaktion mit humanen Hodenproteinen und Spermien, bei einem (1,75 %) mit humanen Spermien und Hodengewebe der Maus. 8 (14,04 %) zeigten eine Reaktion zusätzlich mit humanen Hodenproteinen als auch Hodengewebe der Maus. 10 der Seren (17,54 %) hatten parallele Banden in allen getesteten Geweben.

5.2.1.4 Reaktionen an Bande 13

Insgesamt 25 von 57 Patienten (43,86 %) zeigten eine Reaktion an der Bande 13 gegen humane Spermien. Bei 7 der Patienten (12,28 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 7 der Patienten (12,28 %) gab es zugleich eine Reaktion mit humanem Hodengewebe, bei 2 der Patienten (3,51 %) gab es auch eine Reaktion mit dem Hodengewebe der Maus, bei 9 Patienten (15,79 %) eine Reaktion sowohl mit Hodengewebe der Maus als auch mit humanen Hodenproteinen.

26 Seren (45,61 %) reagierten an Bande 13 mit humanen Hodenproteinen. Bei 8 (14,04 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgeweben, bei 7 der Patienten (12,28 %) gab es auch eine Reaktion mit humanen Spermien. 2 (3,51 %) hatten eine parallele Bande in Hodengewebe der Maus, 9 Patienten (15,79 %) in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien.

15 Patienten (26,32 %) wiesen eine Reaktion bei Bande 13 mit Hodenproteinen der Maus auf. Bei 2 (3,51 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 2 der Patienten (3,51 %) gab es zugleich eine Reaktion mit humanen Spermien, bei 2 (3,51 %) eine mit humanem Hodengewebe, bei 9 Patienten (15,79 %) eine Reaktion mit humanem Hodengewebe und humanen Spermien.

7 Seren (12,28 %) hatten eine Reaktion an Bande 13 mit Nierenproteinen der Maus. Bei 2 der Patienten (3,51 %) gab es keine parallele Bande in den anderen Gewebearten. Bei einem Serum (1,75 %) gab es auch eine Reaktion mit humanen Hodenproteinen. 2 der Seren (3,51 %) zeigten eine Reaktion zusätzlich mit humanen Hodenproteinen als auch Hodengewebe der Maus. 2 der Seren (3,51 %) hatten parallele Banden in allen getesteten Geweben.

5.2.1.5 Reaktionen an Bande 17 (= 67 kDa)

Insgesamt 17 Patienten von 57 (29,82 %) zeigten eine Reaktion an der Bande 17 gegen humane Spermien. Bei 5 der Patienten (8,77 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 7 der Patienten (12,28 %) gab es zugleich eine Reaktion mit humanem Hodengewebe, bei 5 der Patienten (8,77 %) eine Reaktion sowohl mit Hodengewebe der Maus als auch mit humanen Hodenproteinen.

30 Seren (52,63 %) reagierten an Bande 17 mit humanen Hodenproteinen. Bei 12 (21,05 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgeweben, bei 7 der Patienten (12,28 %) gab es auch eine Reaktion mit humanen Spermien. 6 (10,53 %) hatten eine parallele Bande in Hodengewebe der Maus, 5 der Patienten (8,77 %) in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien.

17 Patienten (29,82 %) wiesen eine Reaktion bei Bande 17 mit Hodenproteinen der Maus auf. Bei 6 (10,53 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 6 Seren (10,53 %) gab es eine Reaktion mit humanem Hodengewebe, bei 5 der Patienten (8,77 %) eine Reaktion mit humanem Hodengewebe und humanen Spermien.

9 Seren (15,79 %) hatten eine Reaktion an Bande 17 mit Nierenproteinen der Maus. Bei 3 der Patienten (5,26 %) gab es keine parallele Bande in den anderen Gewebearten. Bei 3 der Patienten (5,26 %) gab es eine Reaktion auch mit humanen Hodenproteinen. 3 der Seren (5,26 %) zeigten eine Reaktion zusätzlich mit humanen Hodenproteinen als auch Hodengewebe der Maus.

5.2.1.6 Reaktionen an Bande 22

Insgesamt 4 Patienten von 57 (7,02 %) zeigten eine Reaktion an der Bande 22 gegen humane Spermien. Bei 2 der Patienten (3,51 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 2 der Patienten (3,51 %) gab es zusätzlich eine Reaktion mit Hodengewebe der Maus.

5 Seren (8,77 %) reagierten an Bande 22 mit humanen Hodenproteinen. Bei 4 (7,02 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgeweben. Einer (1,75 %) hatte eine parallele Bande in Hodengewebe der Maus.

17 Patienten (29,82 %) wiesen eine Reaktion bei Bande 22 mit Hodenproteinen der Maus auf. Bei 14 (24,56 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 2 der Patienten (3,51 %) gab es zusätzlich eine Reaktion mit humanen Spermien, bei 1 der Patienten (1,75 %) eine Reaktion mit humanem Hodengewebe.

5 Seren (8,77 %) hatten eine Reaktion an Bande 22 mit Nierenproteinen der Maus. Bei einem der Patienten (1,75 %) gab es keine parallele Bande in den anderen Gewebearten. 4 der Seren (7,02 %) zeigten eine Reaktion zusätzlich mit Hodengewebe der Maus.

5.2.1.7 Reaktionen an Bande 26

Insgesamt 10 Patienten von 57 (17,54 %) zeigten eine Reaktion an der Bande 26 gegen humane Spermien. Bei 2 der Patienten (3,51 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei 6 der Patienten (10,53 %) gab es zusätzlich eine Reaktion mit humanem Hodengewebe, bei 2 der Patienten (3,51 %) eine Reaktion mit humanem Hodengewebe und Hodenproteinen der Maus.

19 Seren (33,33 %) reagierten an Bande 26 mit humanen Hodenproteinen. Bei 10 Patienten (17,54 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgeweben, bei 6 der Patienten (10,53 %) gab es auch eine Reaktion mit humanen Spermien. Einer (1,75 %) hatte auch eine parallele Bande in Hodengewebe der Maus, 2 der Patienten (3,51 %) in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien.

4 Patienten (7,02 %) wiesen eine Reaktion bei Bande 26 mit Hodenproteinen der Maus auf. Bei einem (1,75 %) war es die alleinige Bande in allen Reproduktionsgewebearten, bei einem der Patienten (1,75 %) gab es eine Reaktion mit humanem Hodengewebe, bei 2 der Patienten (3,51 %) eine Reaktion mit humanem Hodengewebe und humanen Spermien.

3 Seren (5,26 %) hatten eine Reaktion an Bande 26 mit Nierenproteinen der Maus. Bei 2 der Patienten (3,51 %) gab es keine parallele Bande in den anderen Gewebearten. Eine der Seren (1,75 %) zeigte eine Reaktion zusätzlich mit Hodengewebe der Maus.

5.2.2 Statistische Werte der Banden für humane Reproduktionsgewebe

Für die als relevant erachteten Banden für humane Hodenproteine (Banden 6, 8, 9 (= 97 kDa), 13, 17 (= 67 kDa), 22, 26) wurden die Werte Summe der Bandenstärke, Mittelwert, Median und Standardabweichung ermittelt und in den Statistiktabelle im Anhang aufgeführt (siehe Tabelle 7).

Der Vollständigkeit halber wurden alle statistischen Werte aller Banden der humanen Hodenproteine (siehe Tabelle 7), Hodenproteine der Maus (siehe Tabelle 6), der humanen Spermien (siehe Tabelle 8) und der Nierenproteine der Maus (siehe Tabelle 9) in Tabellen aufgeführt.

5.3 Korrelationsergebnisse

Um zu erfassen, inwieweit verschiedene Parameter der Anamnese und der Laboruntersuchungen in Beziehung stehen, wurden jeweils zwei von ihnen mit dem exakten Test von Fisher untersucht (siehe Abbildung 2). Dabei wurden neben Alter auch Vorerkrankungen berücksichtigt, die Ergebnisse des Westernblot, der Immunfluoreszenz und des Immunobeadassays (siehe Tabelle 17). Zusätzlich die Werte der ELISA-Testungen, der Spermioogramme und einiger anderer Laborparameter. Eine genaue Auflistung der durchgeführten Berechnungen kann der Korrelationstabelle (siehe Tabelle 18) entnommen werden.

5.3.1 Beispielrechnung für eine Korrelation

57 Seren wurden mit Westernblot getestet. 4 zeigten sowohl eine Antikörperreaktion an der Bande 8 gegen menschliches Hodengewebe als auch humane Spermien. Jeweils 6 hatten nur eine positive Reaktion mit jeweils einem Gewebe. 41 Patienten zeigten keine Reaktion an der Stelle der Bande 8.

Es soll geprüft werden, ob die Bande 8 im menschlichen Hodengewebe in Beziehung steht zur Bande 8 der humanen Spermien (H_a) oder nicht (H_0) = Nullhypothese.

Die Werte werden so nummeriert, dass $x_1 \leq$ die anderen Häufigkeiten ist.

Es wird festgelegt:

$x_1=4$, $x_2=6$, $n_1-x_1=6$, $n_2-x_2=41$, $n=57$, die restlichen Werte sind der Vierfeldertafel zu entnehmen. Falls die Nullhypothese zutrifft, unterscheiden sich die Anteilswerte

$$p_1 = \frac{x_1}{n_1}, \quad p_2 = \frac{x_2}{n_2} \text{ nur zufällig voneinander.}$$

		Bande 8 Hoden Mensch		
		positiv	negativ	
Bande 8 Spermien Mensch	positiv	4 = x_1	6 = n_1-x_1	10 = n_1
	negativ	6 = x_2	41 = n_2-x_2	47 = n_2
		10 = x	47 = $n-x$	57 = n

Abb. 2: Vierfeldertafel für Beispielrechnung

Ein Signifikanzniveau von 5 % sei gegeben. $\alpha = 0,05$.

Für die Prüfgröße x_1 wird $P(x_1)$ folgendermaßen berechnet:

$$P(x_1) = \frac{\binom{n_1}{n_2} \binom{n_1}{x-x_1}}{\binom{n}{x}} = \frac{n_1! n_2 (n-x)!}{x_1 x_2! (n_1-x_1)! (n_2-x_2)! n!}$$

Wegen $P(X=x_1) = 0,05 < 0,975 \leq P(X \leq x_1) = 0,99$ wird die Nullhypothese (H_0) abgelehnt. Das heißt, es besteht eine Korrelation zwischen der Bande 8 im menschlichen Hodengewebe und der Bande 8 der humanen Spermien.

5.3.2 Korrelationen der Daten

Ein Zusammenhang wurde gefunden zwischen der Bande 6 der humanen Hodenproteine und dem ELISA-Test für Chlamydien IgA.

Ebenso ergab die Berechnung eine Korrelation zwischen der Bande 8 der humanen Hodenproteine und der Bande 8 für Hodenproteine der Maus.

Eine Beziehung gab es auch zwischen der Bande 8 für humane Hodenproteine und der Bande 8 für humane Spermien.

Auch wurde ein Zusammenhang zwischen der Bande 9 für humane Hodenproteine und der Bande 9 für Hodenproteine der Maus ermittelt.

Eine Korrelation wurde ebenfalls für die Bande 9 für humane Hodenproteine und der Immunfluoreszenz gefunden.

Bande 13 für humane Hodenproteine und Bande 13 für Hodenproteine der Maus schie-
nen auch in Beziehung zu stehen.

Ebenso gab es einen Zusammenhang zwischen Bande 13 für humane Hodenproteine
und der Bande 13 für humane Spermien.

Bande 17 für humane Hodenproteine und die Häufigkeit der Varicocezen korrelierten
ebenfalls miteinander.

Eine Beziehung gab es auch zwischen der Bande 17 für humane Spermien und der Ag-
glutination.

Ein Zusammenhang zwischen der Bande 17 für humane Spermien und niedrigen Inhi-
binwerten wurde ebenfalls errechnet

Ebenso eine Korrelation zwischen Bande 22 für humane Spermien und Chlamydien IgA,
ermittelt durch ELISA.

Bande 22 für humane Spermien und niedrige Inhibinwerte schienen ebenfalls in Bezie-
hung zu stehen.

Auch ein Zusammenhang zwischen Bande 22 für humane Spermien und der Morpho-
logie der Spermien wurde errechnet

Bande 26 für humane Hodenproteine und Bande 26 für humane Spermien korrelierten
ebenfalls miteinander.

Trotz Korrelation der Daten kann nicht von einem Kausalzusammenhang ausgegangen
werden. Es kann mit dem exakten Test von Fisher nicht bewiesen werden, ob eine Grö-
ße die andere beeinflusst oder ob beide Größen von einem eventuell dritten Merkmal
beeinflusst werden.

Alle anderen Berechnungen, die durch die Korrelationstabelle (s. Anhang) beschrieben werden, ergaben keine Korrelation.

6. Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit mit dem Westernblot, der Immunfluoreszenz und dem Immunobeadassay getesteten, bereits mit ELISA voruntersuchten, 57 Patientenseren von Männern, die Entzündungszeichen im Genitaltrakt aufwiesen und allesamt auffällige Spermioogramme erzielten, boten anamnestisch ein sehr buntes Bild. Es wurden sowohl Varicoceleen als auch Lageanomalien und Mumps eruiert. Auch Hodentorsionen, Circumcisionen, Hodenatrophien und -prellungen sowie weitere Pathologien des männlichen Reproduktions- und Genitaltraktes ließen sich finden. Ebenso Nikotinkonsum und berufliche Exposition mit Chemikalien und Lösungsmitteln. Es waren sowohl Patienten ohne jegliche Therapie wie auch ehemalige IVF- oder ICSI-Patienten vertreten und welche, die eine medikamentöse Behandlung der Infertilität hinter sich hatten.

Yalow und Berson stellten erstmals 1959 einen Radioimmunoassay (RIA) für Insulin durch Hormonmarkierung mit radioaktiven Isotopen her. Um die Radioaktivität zu umgehen, benutzten Nakane und Pierce 1967 Enzyme zur Markierung in der Immunhistochemie. Den ersten Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) entwickelten Engvall et al. 1971, indem sie das Verfahren der enzymatischen Markierung mit der Immobilisation von Antikörpern auf Oberflächen kombinierten. Die einfache Durchführbarkeit ermöglichte es der ELISA, sich sehr schnell zu einem Standardverfahren zu etablieren. Dank der Übertragung des ELISA-Prinzips auf standardisierte Mikrotiterplatten ließ sich die Durchführung weiter vereinfachen und eine Automatisierung entwickeln. Die ELISA hat eine hohe Spezifität und ermöglicht quantitative Aussagen. Allerdings sind Verletzungen der Spermienmembranen und Freilegung innerer Strukturen möglich. Auch falsch-positive Ergebnisse sind nicht selten, da die ELISA eine schlechte Sensitivität besitzt. Außerdem ist keine Detektion des ASA-Isotyps und seiner physischen Lokalisation möglich (Mazumdar und Levine, 1998).

Der Transfer von großen, durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Molekülen auf ein Trägermaterial wird Blotten genannt. 1975 wurde dieses Verfahren von Edwin Southern entwickelt, dem ein DNA-Transfer von Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran gelang. Später wurden das Northernblot zum Nachweis von RNA und das Westernblot zum Nachweis von Proteinen in Zelllysaten eingeführt. Dadurch lässt sich zwar nicht nachweisen, um welches zelluläre Protein es sich bei dem nachgewiesenen Faktor handelt. Die Wahrscheinlichkeit für einen bestimmten Zellbestandteil kann jedoch zum Beispiel durch vorausgehende Zellfraktionierungsverfahren eingeschränkt werden. Um Proteine aus Polyacrylamidgelen zu transferieren, veränderte Towbin (1979) die elektrischen Parameter. 1984 entwickelte Kyhse-Andersen das in dieser Arbeit verwendete Semi-Dry-Blotting.

Dadurch, dass spezifische Antikörper als Sonde verwendet werden, könnte im Grunde genommen das Vorhandensein jedes gewünschten Proteins nachgewiesen werden, für das ein Antikörper hergestellt werden kann. Vor allem die hohe Spezifität des Western Blot, aber auch die relativ einfache Durchführung, machten dieses Verfahren zu einem elementaren Bestandteil des molekularbiologischen Methodenspektrums. Unspezifische Reaktionen der Antikörper werden durch die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe detektiert und gegebenenfalls ausgeschlossen. Ein Nachteil der Methode ist sicherlich, dass der Nachweis von Protein oder Proteinfragmenten, die kleiner als 5-10 kDa sind, schwierig ist, da diese im Polyacrylamidgel nicht mehr arretiert werden können.

1941 verwendete Albert Coons zum ersten Mal die Immunfluoreszenz, um Antigene auf Zellen nachzuweisen (Coons et al., 1941). Dabei war das Fluorochrom FITC über lange Zeit das einzig erhältliche seiner Art. Weitere Fluorochrome wurden erst später entdeckt, was dazu beitrug, dass die gleichzeitige Markierung mehrerer Antigene ab dem Zeitpunkt möglich wurde (Silverstein, 1957). Durch die Immunfluoreszenz wird die zelluläre Lokalisation der ASA sichtbar. Allerdings lassen sich damit keine spezifischen Antigene identifizieren. Ebenso ist damit die Zahl der an der Reaktion beteiligten Antigen- oder Antikörpermoleküle nicht zu eruieren. Genauso wenig eine Unterscheidung zwischen klinisch relevanten und bedeutungslosen Antikörpern. Es kann lediglich der ASA-Titer

nachgewiesen werden, das heißt, welche Immunglobulin-Klassen beteiligt sind und wie viele Spermatozoen prozentual positiv reagieren (Helmershorst et al., 1999).

Für den Nachweis von ASA wird der Immunobeadassay (IBT) zusammen mit dem Mixed antiglobulin reaction Test (MAR) von der WHO 1999 empfohlen. Krapez et al. führten 1998 eine Umfrage bei den reproduktionsmedizinischen Zentren in Großbritannien durch, welche bestätigte, dass in der Praxis am häufigsten der MAR-Test oder der IBT angewendet wurden, da beide Tests einfach durchzuführen sind und deren Reagenzien als Kit geliefert werden. Die mit Antiglobulinen versehenen Beads heften sich an ASA, die an die Spermatozoenoberfläche sowohl von beweglichen als auch unbeweglichen Spermien gebunden sind. Allerdings lassen sich mit beiden Tests keine spezifischen Antigene identifizieren oder klinisch relevante von nicht-relevanten ASA unterscheiden. Dafür ist es möglich, die Tests mit unterschiedlichen Immunglobulinklassen oder als indirekte Tests mit Spender-Spermatozoen durchzuführen. Es bestehen aber große intra- und interindividuelle Unterschiede bei den Ergebnissen der Tests, weswegen eine Standardisierung nicht möglich ist (Bohring und Krause, 1999). Dafür verfügt der IBT über eine gute Sensitivität und Spezifität (Mazumdar und Levine, 1998).

Nachdem in der vorliegenden Arbeit die Patientendaten mit den erhobenen Laborwerten verglichen wurden, wurden mittels dem exakten Test von Fisher verschiedene Korrelationen gefunden. Einige der als relevant erachteten Banden der humanen Hodenproteine (Banden 6, 8, 9, 13, 17, 22, 26) zeigten eine Korrelation mit dem ELISA-Test für Chlamydien IgA, der Immunfluoreszenz, der Häufigkeit der Varicocezen, Banden für humane Spermien oder Hodenproteine der Maus. Einige der als auffällig bewerteten Banden für humane Spermien (Banden 6, 8, 9, 13, 17, 22, 26) widerum korrelierten mit der Agglutination im Spermogramm, niedrigen Inhibinwerten, Chlamydien IgA, ermittelt durch ELISA oder der Morphologie der Spermien.

Genau definiert waren die Molekulargewichte der Bande 9 bei 97 kDa und der Bande 17 bei 67 kDa.

Ein 67 kDa großes Protein wurde von Dedy 2003 isoliert, was in mindestens 7 Fragmenten mit Serumalbumin der Maus übereinstimmte, woraus man schloss, dass es sich bei dem hier isolierten Antigen wahrscheinlich um ein Albumin oder ein anderes strukturähnliches Protein handelte. Bereits 1986 haben Cheng und Bardin ein immunologisch mit dem Albumin verwandtes Protein namens Testibumin aus testikulärem Gewebe von Ratten isoliert, was ihm mit einem Molekulargewicht von 69 kDa und den pI zwischen 4,5 und 4,85 ähnelte. Dieses auch als CMB-1 bezeichnete Protein konnte in hoher Konzentration in Hoden und Nebenhoden nachgewiesen werden. Den Beweis, dass Albumin im Hoden vorkommt, erbrachten Gelly et al. (1994) durch immunhisto-chemische Färbungen präpubertärer Rattenhoden. Hierbei fiel auf, dass insbesondere Spermato gonien, primäre Spermatozyten und Sertolizellen Albumin angereichert hatten. 1993 postulierten Jarvi et al., dass Albumin im Hoden als Ko-Faktor bei der Stimulation der Spermienmotilität durch den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) fungiert.

Yamamoto et al. zeigten 1994, dass Albumin eine wichtige Rolle bei der endokrinen Regulation der Reproduktion spielt, da es am Transport von Androgenen aus dem peritubulären Raum in die intratubulären Flüssigkeiten von Hoden und Nebenhoden beteiligt ist.

Eine partielle Charakterisierung eines 41 kDa großen Proteins mit einem pI von 4,7, einer Affinität zu Cibacron[®] Blue 3G-A und einer Präzipitation in Anwesenheit von Dextransulfat konnte durch Bonrath (2003) erreicht werden. Aufgrund dessen, dass lediglich erst ein Bruchteil der im Hoden vorkommenden Proteine mittels Peptidsequenzierung schon eindeutig identifiziert worden sind, konnte keine vollständige Charakterisierung vorgenommen werden. Hierfür werden noch weitere Untersuchungen notwendig sein. Es zeigte sich aber, dass das isolierte Hodenantigen nur mit Hodengewebe, nicht aber mit den Kontrollgeweben Hirn, Nebenhoden, Ovar, Spermien oder Niere reagierte. Werden auch bei weiteren infertilen Männern Antikörper gegen dieses Protein gefunden, so kann ein klinischer Zusammenhang angenommen werden.

Ohtani et al. (1993) schloss aus seiner Arbeit mit einer Proteindisulfid Isomerase (PDI) Isoform, dass diese eine entscheidende Rolle bei der Spermio genese und der epidy malen Reifung der Spermatozoen spielt.

Ein multifunktionales Protein, was als Proteindisulfid Isomerase (mus musculus) mit einem Molekulargewicht von 56,6218 kDa, pI 5,99 identifiziert wurde, wurde 2003 von König isoliert und als reaktives Antigen charakterisiert.

Bohring und Krause identifizierten im Jahr 1999 Spermamembranantigene mit folgenden Molekulargewichten: 18 kDa, 29 kDa, 32 kDa, 35 kDa, 42 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 72 kDa, 85 kDa und 110 kDa. Aufgrund der Mikroheterogenität der eindimensionalen elektrophoretischen Auftrennung ist eine Zuordnung von Antikörpern zu einem einzelnen definierten Antigen kaum möglich. Daher bedurfte es der Entwicklung der zweidimensionalen Gelelektrophorese, wobei die erste Dimension nach dem isoelektrischen Punkt auftritt, die zweite Dimension nach Molekülgröße, wodurch bestimmte Proteine isoliert werden können. Bohring und Krause bemerkten 2001, dass bestimmte Antigene häufiger bei den primären Fertilitätsstörungen vorkommen, andere wiederum bei den Zuständen nach Vasektomie.

Der Bereich um 97 kDa, in dieser Arbeit Bande 9 genannt, hebt sich durch vermehrte Antikörperreaktionen ab. Ein Zusammenhang zwischen humanen Hodenproteinen und Hodenproteinen der Maus, wie auch zwischen humanen Hodenproteinen und der Immunfluoreszenz, konnte gefunden werden. Auch die Bande 8 mit einem Molekulargewicht von schätzungsweise 100-105 kDa, zeigte eine Korrelation zwischen humanen Hodenproteinen und Hodenproteinen der Maus, zusätzlich aber auch zwischen humanen Hodenproteinen und humanen Spermien. Die Bande 6, die dem Molekulargewicht von 110-115 kDa entsprechen dürfte, gab einen Hinweis auf einen Zusammenhang der Antikörper gegen humane Hodenproteine und dem ELISA-Test für Chlamydien IgA. Auch Bande 13 mit einem geschätzten Molekulargewicht zwischen 80-85 kDa stach durch vermehrte Antikörperreaktionen hervor. Hier schien es eine Korrelation zu geben zwischen den Geweben humane Hodenproteine und Hodenproteine der Maus sowie humane Hodenproteine und humane Spermien. Der Bande 17 entsprachen 67 kDa. Zusätzlich war diese Bande interessant wegen dem Zusammenhang zwischen Antikörpern gegen humane Hodenproteine und der Häufigkeit von Varicocelen, aber auch der Korrelation zwischen humanen Spermiantikörpern und der Agglutination im Spermiogramm, ebenso wie der zwischen humanen Spermiantikörpern und niedrigen Inhi-

binwerten. Dem Molekulargewicht zu urteilen könnte es sich um das von Dedy 2003 isolierte Antigen handeln. Die Bande 22 lag schätzungsweise zwischen 50-55 kDa. Sie ließ einen Zusammenhang zwischen humanen Spermienantikörpern und Chlamydien IgA, ermittelt durch ELISA vermuten. Zusätzlich aber auch zwischen humanen Spermienantikörpern und niedrigen Inhibinwerten und humanen Spermienantikörpern und der Morphologie der Spermien. Die Bande 26 mit einem Molekulargewicht zwischen 40-44 kDa gab einen Hinweis für einen Zusammenhang zwischen humanen Hodenproteinen und humanen Spermien.

Es bedarf aber weiterer Forschung, um die hier aufgeführten Antigene bzw. Antikörper zu isolieren und abschließend zu charakterisieren.

Dafür ist auch eine Entwicklung antigen-spezifischer Tests absolut notwendig (Naz, 2005). Dafür können auch Tiermodelle benutzt werden, weil viele Spermatozoen-Antigene in der Evolution konserviert sind (Paradowska et al., 2006).

Den apikalen Teil des Spermienkopfes bildet das Akrosom (Mann, 1964), wobei eine innere von einer äußeren Akrosomenmembran mit dazwischen eingeschlossener Akrosomenmatrix unterschieden wird, welche viele hydrolytische Enzyme, die für die Lyse der äußeren Eizellmembran benötigt werden, beinhaltet. Das Akrosom stellt somit eine lysosomenähnliche Organelle dar (Allison und Hartree, 1970) und spielt bei der Penetration des Spermiums durch die äußere Eizelhülle eine wichtige Rolle. Dabei wird die Verschmelzung der Spermienmembran mit der äußeren Akrosomenmembran Akrosomreaktion genannt (Saacke und Mashall, 1968), welche unabdingbar ist für die Penetration und Fertilisation der Eizelle (Austin, 1975). Dabei zeigte sich bei Präparaten nach Orchidektomie, dass die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion durch Kälteexposition vom Caput bis zur Cauda des Nebenhodens zunimmt (Haidl et al., 1994). Hierbei übernimmt die Zona pellucida die Aufgabe der Einleitung der Spermien-Oozyten-Interaktion, der Akrosomenreaktion und dem Verhindern von Polyspermie (Montag und van der Ven, 2000).

Die Immunfluoreszenz ist eine Möglichkeit der Akrosomdarstellung, wobei eine ausschließlich auf die Akrosomenkappe beschränkte Fluoreszenz bei Ebern, Kaninchen, Hamstern, Ratte, Maus sowie humanen Spermien beobachtet werden konnte (Töpfer-Petersen et al., 1983). Mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz untersuchte Day 1996 die Markierungen von ASA aus Pferdehengsten, wobei sich intensive Markierungen an Kopf und Schwanz zeigten; das Mittelstück in diesen Versuchen jedoch unmarkiert blieb. 1991 ermittelten Sinton et al. eine Verteilung der Bindung von jeweils 29,4 % der aus Seminalplasma stammenden ASA auf Mittel- und Schwanzstück, sowie von 41,2 % auf den Spermatozoen-Kopf bei der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Allerdings wurden in den beiden vorgenannten Untersuchungen die Ejakulatausstriche mittels Lufttrocknung und z. T. Methanol fixiert. Bei dieser Art der Fixierung wurde mehrfach ein schädlicher Einfluss auf die Plasmamembranen der Spermatozoen vermutet (Haas et al., 1988). Es können falsch-positive Ergebnisse gefunden werden, da dadurch normalerweise intern liegende Antigene freigelegt werden können (Bronson et al., 1984). Jones stellte 1980 die These auf, dass die Bindung von Fluorochromen am Äquatorial-Segment, Genick und Mittelstück grundsätzlich unspezifisch ist.

In der vorliegenden Arbeit zeigten 35,09 % eine positive Reaktion bei der Immunfluoreszenz. Dabei wurde bei 29,82 % eine Fluoreszenz um den Spermischwanz, bei 3,51 % eine um den Spermienkopf und –schwanz und bei 1,75 % eine um das Äquatoralsegment beobachtet. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Day und Sinon wurde zur Fixierung 2 % Formalin benutzt, was weniger die Plasmamembranen der Spermatozoen zu zerstören scheint. Daher zeigten fast alle der positiv Getesteten eine Fluoreszenz um den Schwanz. Lediglich bei zwei Proben gab es zusätzlich auch eine Fluoreszenz des Spermienkopfes. Wenn Jones mit seiner These richtig liegt, ist die Fluoreszenz der einen Probe um das Äquatoralsegment als unspezifisch zu werten.

1995 fanden Wolf et al. mit Hilfe des Immunobeadassays heraus, dass ASA über das gesamte Spermatozoen gleichmäßig verteilt sind. Einzig in der Testgruppe, in welcher unter 80 % der Spermatozoen IgG-Antikörper gebunden hatten, waren 50 % der ASA am Flagellum und 50 % am Kopf gebunden. Es zeigte sich, dass die Rate der Fertilisie-

zung bei der Gruppe mit Kopf-gebundenen ASA signifikant höher als bei der Gruppe mit Schwanz-gebundenen ASA war.

Das Bindungsverhalten von ASA am Flagellum und deren Einfluss auf die Motilität der Spermien wurde 1982 von Bronson et al. mit dem Immunobead-Test untersucht. Die Motilität erschien dabei am meisten reduziert bei Bindung der ASA der Klassen IgA und IgG an den distalen Abschnitten des Schwanzes, weitgehend unbeeinflusst bei Bindung an die Schwanzspitze. Keinen Einfluss auf die Motilität hatten kopfgebundene Antikörper. ASA der Klasse IgM waren auch bei Lokalisation an der Schwanzspitze stark einschränkend auf die Motilität, eine Bindung am Kopf fand nicht statt. Zur Lokalisierung von Antigenen erweist sich der Immunobead-assay wegen der Größe der Marker weniger gut geeignet als die Immunfluoreszenz.

Young und Smithwick untersuchten 1991 ASA mithilfe des indirekten Immunfluoreszenztestes und des indirekten Immungold-Testes. Dabei zeigten sich die eindrucksvollsten Markierungen am Mittelstück, welches u.a. spiralg angeordnete Mitochondrien enthält, gefolgt von Kopf und Hauptstück des Flagellums. Nur im Immunobeadassay wich die Verteilung hiervon insofern ab, dass hier die Kopfbindungen überwogen.

5,26 % der Seren haben in der vorliegenden Arbeit ein positives Ergebnis beim indirekten Immunobeadassay erzielt, wobei die Verteilung auf alle Spermienkompartimente nahezu gleichmäßig gegeben war, ähnlich wie bei den meisten Testgruppen von Wolf et al. Eine Bindung an die Schwanzspitze wurde als nicht signifikant gewertet.

Vergleicht man die Ergebnisse aller durchgeführten Tests miteinander, fällt auf, dass gerade beim Westernblot eine Vielzahl von Antikörperreaktionen detektiert wurden, die bei den anderen Tests nicht unbedingt bestätigt wurden. Lediglich der Bereich um 97 kDA schien mit der Immunfluoreszenz zu korrelieren. Ob diese Korrelation zufälliger Natur ist oder doch eine Signifikanz vorliegt, müsste explizit hierfür noch mal untersucht werden.

Der Immunobeadassay, der im klinischen Alltag zum Standardverfahren zur Detektion von ASA gehört, erwies sich hier nur in drei Fällen als positiv, obwohl durch die anderen Testverfahren bei weitaus mehr Patienten ASA gefunden wurden.

Es zeigte sich eine hohe Prävalenz für antitestikuläre Autoantikörpern bei dem hiesigen, relativ kleinen Patientenkollektiv mit stummer genitaler Entzündung. Dies kann darauf hindeuten, dass die zugrunde liegenden immunologischen Prozesse pathologische SpermioGramme bedingen. Interessanterweise waren alle Untersuchungen zum Nachweis von Autoantikörpern in der Zusammenschau nicht richtig schlüssig. Dies kann darauf hindeuten, dass Antihoden-Autoimmunantikörper eine neue Klasse von Antikörpern darstellen. Es wird vermutet, dass diese Antikörper auf lange Sicht zu einer Beeinträchtigung der Hodenfunktion führen und damit schrittweise die Spermienproduktion senken können. Um allerdings genauere Aussagen diesbezüglich treffen zu können, bedarf es eines Patientenkollektivs, was nach Möglichkeit weitgehend homogene Anamnesedaten aufweist, da bei der hier vorliegenden Inhomogenität nicht ausgeschlossen werden kann, dass falsch positive oder falsch negative Ergebnisse eruiert wurden. Auch wäre eine größere Patientenpopulation wünschenswert gewesen, um repräsentative Daten zu erlangen.

7. Ausblick

Diese Arbeit wies mit dem Westernblot sowohl Antikörper gegen Spermien als auch testikuläre Proteine bei Sterilitätspatienten mit Entzündungszeichen im Genitaltrakt nach. Zusätzlich wurde erforscht, inwieweit sich die im Westernblot gefundenen Autoantikörper auch im Immunobeadassay oder der Immunfluoreszenz bestätigen ließen. Die Zusammenschau der Teste ergab, dass es dringend notwendig ist, antigen-spezifische Tests zu entwickeln, da es sich bei den gefundenen Autoantikörpern um mindestens zwei Klassen, nämlich Antispermienantikörper und Antihodenantikörper, handelt. Unklar ist außerdem, ob die gefundenen Antikörper tatsächlich für die Entwicklung einer Infertilität beim Mann verantwortlich sind und ob sie im Rahmen einer testikulären Infektion entstanden sind.

In der Vergangenheit wurde sehr viel im Bereich der ASA geforscht. Auf dem Gebiet der Antihodenantikörper gibt es aber noch nicht so viele Arbeiten. Inwiefern diese eine immunologisch bedingte Unfruchtbarkeit bedingen, wird auf jeden Fall Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Ebenso weiterer Studien bedarf es, den Zusammenhang zwischen testikulären Antikörpern und ASA zu ermitteln. Erst wenn man weiß, ob die Entstehung beider Antikörperklassen auf eine gemeinsame Ursache zurückzuführen ist, bzw. ob sie sich gegenseitig bedingen können, wird auch eine ursächliche Therapie gefunden werden.

Aber auch hinsichtlich der Wahl der für den Patienten geeigneten Behandlung zur Erfüllung seines Kinderwunsches ist es unabdingbar, eine ursächliche Behandlungsmethode zu finden, um sowohl dem Patienten und seiner Partnerin einen langen Leidensweg zu ersparen als auch unnötige, da am Ende nicht erfolgreiche Methoden, von vornherein auszuschließen.

Trotzdem ist es wichtig, dem Hilfe suchenden Patienten eine Therapie anzubieten, auch wenn man die genaue Ursache seiner Infertilität noch nicht kennt. Insofern muss man den von Erfolg gekrönten Behandlungsversuch mit Diclofenac und Doxycyclin eines Patienten mit einer nicht obstruktiven Azoospermie und erhöhten Leukozytenwerten im Sperma als innovativ bezeichnen (Montag, van der Ven, Haidl, 1999). Dies insbesondere mit Blick dahin, dass diesem Patienten durch die antiinflammatorische und antiphlogistische Behandlung eine Hodenbiopsie erspart blieb.

8. Zusammenfassung

Chronische Entzündungen im Genitaltrakt des Mannes können die Spermienqualität erheblich beeinträchtigen und somit zu einem pathologischen Spermioogramm führen. Die Ätiologie ist häufig unbekannt. Montag, van der Ven und Haidl haben aber im Jahr 1999 erforscht, dass einige Patienten mit genitaler Entzündung von einer antiphlogistischen und antibiotischen Behandlung profitieren und die Spermien-Parameter dadurch verbessert werden können, auch wenn dies in manchen Fällen nur für einen begrenzten Zeitraum möglich ist.

Um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu begreifen, wurden in dieser prospektiven Studie 57 männliche Patienten mit Entzündungszeichen im Genitaltrakt hinsichtlich ihres Spermioogrammes und des Immunstatus untersucht. Weitere 8 Spender mit nachgewiesener Fruchtbarkeit dienten als Kontrolle. Patienten- und Kontrollseren wurden mithilfe der 10 % SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Es wurde getestet, ob sie Antikörperreaktionen gegen humane Spermien, menschliches Hodengewebe, Hoden- und Nierengewebe der Maus eingehen. Darüber hinaus wurden alle Seren mit dem indirekten Immunfluoreszenztest und dem indirekten Immunobeadassay für menschliche Spermien untersucht. Zuvor wurde das Vorhandensein von Antikörpern gegen Spermien mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Test (Synelisa Spermien, Amersham Bioscience) geprüft, wobei ein Wert > 20 U/ml als positiv gewertet wurde.

Als Gemeinsamkeit hatte das anamnestisch ziemlich inhomogene, aus 57 Männern bestehende, Patientenkollektiv außer Entzündungszeichen im Genitaltrakt ein auffälliges Spermioogramm.

Nach Westernblotanalyse wiesen 56 der 57 Patientenseren (98,25 %) eine positive Reaktion mit humanen Hodenproteinen auf. 52 Seren (91,23 %) zeigten eine positive Reaktion mit humanen Spermien, 46 Seren (80,70 %) eine positive Reaktion mit humanen Spermien bei den als relevant gesehenen Banden. Alle 57 Patientenseren zeigten eine positive Reaktion mit Hodenproteinen der Maus, 45 Patientenseren (78,95 %) zeigten eine positive Reaktion mit Nierenproteinen der Maus.

Die Ergebnisse des Westernblot wurden mit denen der konventionellen Nachweise für Antikörper gegen Spermienproteine verglichen. Ein positives Ergebnis beim Immunfluo-

reszenztest erzielten 20 der Patientenserum (35,09 %). Lediglich 3 der Seren (5,26 %) ergaben ein positives Ergebnis beim indirekten Immunobeadassay.

Die gleichen Untersuchungen wurden mit den Kontrollseren durchgeführt, aber diese zeigten weder eine positive Reaktion im Westernblot, noch bei der Immunfluoreszenz oder beim Immunobeadassay.

Nachdem die Patientendaten mit den erhobenen Laborwerten verglichen wurden, wurde mittels dem exakten Test von Fisher eine Korrelation gefunden zwischen der Reaktion auf humane Hodenproteine im Westernblot bei 110-115 kDa und dem ELISA-Test für Chlamydien IgA, zwischen der Reaktion auf humane Hodenproteine und der Reaktion auf Hodenproteine der Maus bei 100-105 kDa, zwischen der Reaktion auf humane Hodenproteine und der Reaktion auf humane Spermien bei 100-105 kDa, zwischen der Reaktion auf humane Hodenproteine und der Reaktion auf Hodenproteine der Maus bei 97 kDa, zwischen der Reaktion auf humane Hodenproteine bei 97 kDa und der Immunfluoreszenz, zwischen der Reaktion auf humane Hodenproteine und der Reaktion auf Hodenproteine der Maus bei 80-85 kDa, zwischen der Reaktion auf humane Hodenproteine und der Reaktion auf humane Spermien bei 80-85 kDa, zwischen der Reaktion auf humane Hodenproteine bei 67 kDa und der Häufigkeit der Varicoceleen, zwischen der Reaktion auf humane Spermien bei 67 kDa und der Agglutination im Spermioogramm, zwischen der Reaktion auf humane Spermien bei 67 kDa und niedrigen Inhibinwerten, zwischen der Reaktion auf humane Spermien bei 50-55 kDa und Chlamydien IgA, ermittelt durch ELISA, zwischen der Reaktion auf humane Spermien bei 50-55 kDa und niedrigen Inhibinwerten, zwischen der Reaktion auf humane Spermien bei 50-55 kDa und der Morphologie der Spermien. Trotz Korrelation der Daten kann aber nicht von vornherein von einem Kausalzusammenhang ausgegangen werden.

Insgesamt zeigte sich eine hohe Prävalenz für antitestikuläre Autoantikörper bei dem hiesigen, relativ kleinen Patientenkollektiv. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die zugrunde liegenden immunologischen Prozesse pathologische Spermioogramme bedingen. In der Zusammenschau waren aber die Ergebnisse der Nachweise für Autoantikörper nicht hundertprozentig schlüssig, was darauf hindeuten kann, dass Antihoden-Autoimmunantikörper eine neue Klasse von Antikörpern darstellen. Es wird angenommen, dass diese Antikörper zu einer Beeinträchtigung der Hodenfunktion führen, damit schrittweise die Spermienproduktion senken und eine Infertilität bedingen können.

9. Anhang

Tab. 4: Normwerte

FSH (U/l)	Normwert: 1,2-10,1
Testosteron (ng/ml)	Normwert: 2,88-11,48
Prolaktin (ng/ml)	Normwert: 3,10-15,15
Inhibin (pg/ml)	Normwert: > 100
Karenz	Optimal: 3-10 Tage
Volumen	2-6 ml
pH-Wert	7-7,8
Motilität	a + b > 50 %
Zahl der Spermien	20-120 Millionen pro ml Ejakulat
Morphologie in %	Normwert: > 30 %
Leukozyten	Normalbefund: keine Leukozyten im Ejakulat
Agglutination	Normalbefund: keine Agglutination nachweisbar
Makrophagen	Normalbefund: keine Makrophagen im Ejakulat
Eosin % vital	Normwert: > 60 %
Chlamydien IgA	Normalbefund: kein IgA nachweisbar
Serumantikörper (U/ml)	Normwert: < 20
IL 6 (pg/ml)	Normwert: < 70

Tab. 5: Zeichenerklärung

(+)	Spärlich vorhanden
+	Leicht vermehrt, wenig
++	Vermehrt
+++	Stark vermehrt
++++	Massenhaft
/	Negativ, nicht vorhanden
	Leere Kästchen bedeuten, dass keine Untersuchung stattgefunden hat

Westernblot-Urdatenblatt 1 für AmHA (Patient Nr. 1 bis 28)

Masse Bande Patient Nr.

	<u>e</u>	
	<u>2a</u>	(11)/(20)/(22)/(27)
	<u>3a</u>	27
	<u>4a</u>	(9)/(10)/(16)/(20)/(21)/(23)/25
	<u>6a</u>	(7)/(8)/(9)/(11)/19+/20/21/22/(23)/24/(26)/(27)/(28)
	<u>8a</u>	1/(2)/3/(4)/5+/(7)/(8)/20/(24)/(27)/(28)
97 kDa	<u>9a</u>	1=/(2)/3/(6)/(9)/(10)/(11)/(13)/(14)/(15)/(16)/(17)/(18)/19+/21/22=/(23)/26+/(27)/28=
	<u>10a</u>	(24)
	<u>11a</u>	(12)/(19)/(27)
	<u>12a</u>	
	<u>13a</u>	1/5+/(6)/(9)/(10)/23+/26/(28)
	<u>14a</u>	5/(19)/26/(28)
	<u>15a</u>	27+=
	<u>16a</u>	23/(27)
67 kDa	<u>17a</u>	(5)/(10)/(20)/(25)/(26)/(27)/(28)
	<u>18a</u>	9/(20)/22/24+/(28)
	<u>20a</u>	(19)/(27)/(28)
	<u>21a</u>	(27)
	<u>22a</u>	(19)/20/(22)=/24+/27+/(28)
	<u>23a</u>	
	<u>e</u>	
45 kDa	<u>25a</u>	(14)/(22)
	<u>26a</u>	
	<u>28a</u>	
	<u>29a</u>	(1)/(2)/(3)/(22)/(23)
	<u>30a</u>	19/(22)
	<u>32a</u>	(27)
	<u>33a</u>	19+

29 kDa

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus (AmHA).

Definition der Fraktionen

2a-4a/6a/8a-11a/13a-14a/16a-18a/20a-23a/25a-26a/28a-30a/33a

(Antikörperfraktionen mit 2 und mehr Patienten)

Die Zahlen rechtsseitig des Bandenschemas entsprechen dem Patientencode.

Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode

ließen sich die molekularen Größenordnungen in kDa nur schätzen.

	<u>36a</u>	3
	<u>e</u>	
	<u>e</u>	
21 kDa	<u>e</u>	(20)
	<u>e</u>	3+

e	Einzelbanden, für die keine Gruppen erstellt
=	Doppelbande
()	Schwache Bande
+	Starke Bande

Westernblot-Urdatenblatt 1 für AmHA (Patient Nr. 29 bis 57)

Masse Bande Patient Nr.

	<u>e</u>	36
	<u>2a</u>	
	<u>3a</u>	(32)/(40)/(48)
	<u>4a</u>	(29)/(31)/(32)/(37)/(40)/(44)/49+/(51)/(52)/(56)
	<u>6a</u>	31+/32+/33+/34=/36/38+/39+/40/42+/(44)/45+=/46+/50=/(52)/53/54/55+
	<u>8a</u>	(33)/(35)/(36)=/(37)/49
97 kDa	<u>9a</u>	(29)/31/32+="/(33)/(34)/(35)/37/38=/(39)/(40)/(41)/(42)/44+/45+/(48)/50+="/(55)/56+
	<u>10a</u>	(39)/(48)
	<u>11a</u>	36/(39)/(53)
	<u>12a</u>	(49)
	<u>13a</u>	(31)/(38)=/(46)/(47)/(48)/50=/52+=
	<u>14a</u>	(31)/32/(33)/(34)/(35)/43+/(44)/(50)
	<u>15a</u>	
	<u>16a</u>	(29)/(45)/46+/(47)/(48)/49
67 kDa	<u>17a</u>	30/32/33/(38)/(45)/46/(48)/(49)/(50)/(51)
	<u>18a</u>	31/(35)/51
	<u>20a</u>	(34)/(57)
	<u>21a</u>	31+/(32)/35/(38)=/51/(52)
	<u>22a</u>	(32)/(34)/(38)/41+/42/(44)/47/(50)/(53)/54/(57)
	<u>23a</u>	(49)/(50)
	<u>e</u>	(50)
45 kDa	<u>25a</u>	(29)/36+/(37)/(39)
	<u>26a</u>	(39)/40/(48)/50
	<u>28a</u>	(39)/(52)
	<u>29a</u>	(32)=
	<u>30a</u>	(32)=
	<u>32a</u>	
	<u>33a</u>	(32)

29 kDa

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus (AmHA).

Definition der Fraktionen

2a-4a/6a/8a-11a/13a-14a/16a-18a/20a-23a/25a-26a/28a-30a/33a

(Antikörperfraktionen mit 2 und mehr Patienten)

Die Zahlen rechtsseitig des Bandenschemas entsprechen dem Patientencode.

Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode

ließen sich die molekularen Größenordnungen in kDa nur schätzen.

36a	
<u>e</u>	(35)
<u>e</u>	39+
21 kDa	<u>e</u>
<u>e</u>	

e	Einzelbanden, für die keine Gruppen erstellt werden
=	Doppelbande
()	Schwache Bande
+	Starke Bande

Westernblot-Urdatenblatt 2 für AHA (Patient Nr. 1 bis 28)

Masse Bande Patient Nr.

	<u>1b</u>	(9)/10
	<u>2b</u>	10/11/(12)/(16)
	<u>3b</u>	
	<u>4b</u>	11+/(16)
	<u>6b</u>	(10)/(28)
	<u>7b</u>	(11)/20+/(21)/(24)
	<u>8b</u>	3/(4)=/5+/(6)(8)/(10)/27+
97 kDa	<u>9b</u>	1=/6=/7=/8)=/10/13=/14+="/15=/(16)=/17=/18+="/19+="/20+/21/22+="/(24)/(25)=/26=/27+="/(28)
	<u>10b</u>	(5)=/(8)/(19)
	<u>11b</u>	11+/(22)/(24)/25/27
	<u>12b</u>	(3)/(5)=/19+/(27)
	<u>13b</u>	5+6=/(9)/(12)=/(19)=/25/(26)/27=/28=
	<u>14b</u>	(3)=/(10)/(16)/(19)/(24)/(26)/27/(28)
	<u>15b</u>	27
	<u>16b</u>	(6)/(19)/(27)
67 kDa	<u>17b</u>	2+="/(3)=/(5)=/(7)=/8=/(10)/11/(13)=/14=/15+="/17+="/18=/"20=/"(26)/(27)/(28)
	<u>18b</u>	(11)/22/(27)/(28)
	<u>19b</u>	
	<u>20b</u>	(27)
	<u>21b</u>	
	<u>22b</u>	(7)/(26)
	<u>23b</u>	(9)=/(20)
45 kDa	<u>25b</u>	(7)/(10)/(18)
	<u>26b</u>	3+="/(10)/27=/(28)
	<u>27b</u>	
	<u>28b</u>	(9)=/(11)=/(12)=/(16)
	<u>29b</u>	(3)
	<u>e</u>	

29 kDa	<u>e</u>	
	<u>e</u>	14=
	<u>e</u>	3
	<u>e</u>	(1)
	<u>e</u>	(1)

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen menschliche Hodenproteine (AHA)
 Definition der Fraktionen
 1b-4b/6b-23b/25b-28b
 (Antikörperfraktionen mit 2 und mehr Patienten)
 Die Zahlen rechtsseitig des Bandenschemas entsprechen dem Patientencode.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode
 ließen sich die molekularen Größenordnungen in kDa nur schätzen.

21 kDa

e	Einzelbanden, für die keine Gruppen erstellt
=	Doppelbande
()	Schwache Bande
+	Starke Bande

Westernblot-Urdatenblatt 2 für AHA (Patient Nr. 29 bis 49)

Masse Bande Patient Nr.

	<u>1b</u>	(31)/(44)/(49)
	<u>2b</u>	(48)/(49)
	<u>3b</u>	(48)
	<u>4b</u>	(32)/(36)
	<u>6b</u>	(34)/(46)
	<u>7b</u>	
	<u>8b</u>	(33)/(36)=/(49)
97 kDa	<u>9b</u>	(29)/(31)/32+="/(33)/34+="/35+/(37)="/38="/(39)/(40)="/(41)/(42)/(43)="/44="/45+="/(46)="/(48)/49
	<u>10b</u>	(29)/(30)/(33)/(48)
	<u>11b</u>	(36)/(38)="/(44)/47=
	<u>12b</u>	(48)/(49)
	<u>13b</u>	29="/30="/(31)="/35="/37="/(38)="/41="/42="/(45)/(47)="/(48)/(49)
	<u>14b</u>	32/(33)/(40)/(43)/(44)/(49)
	<u>15b</u>	-44
	<u>16b</u>	(36)/(45)/(47)/(48)/49
67 kDa	<u>17b</u>	(29)/(31)/32/(33)/(37)="/38="/(39)/(41)/(42)/46="/(47)
	<u>18b</u>	(36)/(43)/(47)/(48)
	<u>19b</u>	(41)
	<u>20b</u>	(44)
	<u>21b</u>	(40)
	<u>22b</u>	(31)
	<u>23b</u>	(40)/(46)/(47)/(49)
45 kDa	<u>25b</u>	(33)="/(35)="/(47)/(49)
	<u>26b</u>	(29)/(30)/(35)="/39="/(41)/42="/(44)="/47+="/48=
	<u>27b</u>	43="/(49)=
	<u>28b</u>	(32)/(40)/46+="/
	<u>29b</u>	
	<u>e</u>	(40)

<u>29 kDa</u>	<u>e</u>
	<u>e</u>

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen menschliche Hodenproteine (AHA)
 Definition der Fraktionen
 1b-4b/6b-23b/25b-28b
 (Antikörperfraktionen mit 2 und mehr Patienten)
 Die Zahlen rechtsseitig des Bandenschemas entsprechen dem Patientencode.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode
 ließen sich die molekularen Größenordnungen in kDa nur schätzen.

21 kDa

e	Einzelbanden, für die keine Gruppen erstellt werden
=	Doppelbande
()	Schwache Bande
+	Starke Bande

Westernblot-Urdatenblatt 2 für AHA (Patient Nr. 50 bis 57)

Masse	Bande	Patient Nr.
	1b	(50)/(52)/(53)/56
	2b	(50)/(52)/53/(56)
	3b	53
	4b	
	6b	
	7b	
	8b	
97 kDa	9b	(50)/(54)/55=/(56)/57+=
	10b	
	11b	(53)/54+/(55)/(57)
	12b	(51)/53+/(57)
	13b	(50)=/52+="/(54)=/(55)=/(57)
	14b	(50)/(57)
	15b	(53)/(54)
	16b	
67 kDa	17b	(50)/(54)/(56)
	18b	(56)/(57)
	19b	(57)
	20b	
	21b	(52)/(55)/(56)
	22b	(50)/(54)
	23b	(50)/(52)/(56)/(57)
45 kDa	25b	(50)/Anti-Human IgG
	26b	50=/51=/53=/(54)=/(55)/(57)=
	27b	
	28b	(52)
	29b	
	e	

29 kDa e (56)

e

e

e

e

21 kDa

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen menschliche Hodenproteine (AHA)

Definition der Fraktionen

1b-4b/6b-23b/25b-28b

(Antikörperfraktionen mit 2 und mehr Patienten)

Die Zahlen rechtsseitig des Bandenschemas entsprechen dem Patientencode.

Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode

ließen sich die molekularen Größenordnungen in kDa nur schätzen.

e	Einzelbanden, für die keine Gruppen erstellt werden
=	Doppelbande
()	Schwache Bande
+	Starke Bande

Westernblot-Urdatenblatt 3 für ASA (Patient Nr. 1 bis 32)

Masse Bande Patient Nr.

	<u>1c</u>	
	<u>2c</u>	
	<u>3c</u>	20/27+
	<u>4c</u>	(11)/(19)/(22)=/25+/(31)
	<u>5c</u>	(16)/(18)/(30)/(32)
	<u>6c</u>	13=/19=/(20)/(24)/(25)/(27)=/(31)
	<u>7c</u>	(8)/(11)/(16)=/(18)/(22)/26/(27)=
	<u>8c</u>	(3)/(6)/(7)/(8)/(12)/(16)/26/(27)=/(28)
97 kDa	<u>9c</u>	(1)/(3)/(7)/(8)/(13)/(16)/(18)/(20)/(25)/(26)/(27)=/(31)/(32)
	<u>10c</u>	(3)/(11)/(20)
	<u>11c</u>	(20)/(22)/(24)/(27)/(28)
	<u>12c</u>	(7)/(8)/9/(13)/(20)/(22)/(23)/(25)/26+/(28)/31=/(32)
	<u>13c</u>	(1)/5+/(6)/(9)/(11)/16=/(18)/(22)/23/25/26/(27)=/(28)
	<u>14c</u>	(8)/(11)/13+/(16)/24
	<u>15c</u>	
	<u>16c</u>	16+
67 kDa	<u>17c</u>	(2)/(5)/(7)/8/(13)=/(18)/(19)/22/(23)/26+/28+/32
	<u>18c</u>	(11)/(22)/24/(27)
	<u>e</u>	
	<u>e</u>	
	<u>21c</u>	
	<u>22c</u>	(21)
	<u>23c</u>	(20)/(23)/(29)/(32)
	<u>e</u>	
45 kDa	<u>25c</u>	
	<u>26c</u>	14+/(20)/(27)
	<u>27c</u>	
	<u>28c</u>	
	<u>31c</u>	(22)
	<u>32c</u>	(27)
	<u>34c</u>	(8)/(27)
	<u>e</u>	
29 kDa	<u>35c</u>	

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen menschliche Spermienproteine (ASA)

Definition der Fraktionen

2c-18c/21c-23c/25c-28c/31c-32c/34c-38c

(Antikörperfraktionen mit 2 und mehr Patienten)

Die Zahlen rechtsseitig des Bandenschemas entsprechen dem Patientencode.

Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode

ließen sich die molekularen Größenordnungen in kDa nur schätzen.

	<u>36c</u>	(1)/(2)/3
	<u>37c</u>	
	<u>38c</u>	(1)/(20)
21 kDa	<u>e</u>	3+

e	Einzelbanden, für die keine Gruppen erstellt werden
=	Doppelbande
()	Schwache Bande
+	Starke Bande

Westernblot-Urdatenblatt 3 für ASA (Patient Nr. 33 bis 57)

Masse Bande Patient Nr.

	1c	(49)
	2c	51+/(54)
	3c	(35)/43/(45)/(49)/(50)
	4c	(37)=/(41)/(42)/(48)/(51)/(52)
	5c	
	6c	(33)/34/38/(39)/(40)/(41)/(45)/(48)/(49)/(50)/51/53=/(54)=
	7c	(40)/(42)/(50)/(52)
	8c	(44)
97 kDa	9c	(33)/(34)/38+/(39)/(40)/(41)/(42)/(45)/(48)/(51)/(52)/(54)=/(56)/57
	10c	36+/(37)/(39)
	11c	
	12c	(33)/(34)/35/41/(42)/(44)/(47)/(48)/(50)=/51=/53+
	13c	(33)/(37)/(38)/41/(42)/45=/(47)/(48)/(49)/52+=/(54)=/(56)
	14c	33/(38)/(40)/(51)/(52)
	15c	(33)/(34)
	16c	(37)/(45)/(47)/(49)
67 kDa	17c	(34)/(37)/(38)/(52)/(54)
	18c	(48)/(49)/(51)/(53)/(56)/(57)
	e	(38)
	e	(52)
	21c	(39)/(51)/(56)
	22c	(34)=/(53)/(56)
	23c	(34)=/39+/(40)/(49)/(50)/(52)/(54)/(57)
	e	(47)
45 kDa	25c	(39)/(50)/(52)/(55)
	26c	(47)/(48)/(50)/(51)/(53)/(54)/(57)
	27c	(45)/(49)
	28c	(40)/(52)/55
	31c	(53)
	32c	(51)
	34c	(51)
29 kDa	e	(35)=
	35c	45=/(51)/(53)

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen menschliche Spermienproteine (ASA)

Definition der Fraktionen

2c-18c/21c-23c/25c-28c/31c-32c/34c-38c

(Antikörperfraktionen mit 2 und mehr Patienten)

Die Zahlen rechtsseitig des Bandenschemas entsprechen dem Patientencode.

Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode

ließen sich die molekularen Größenordnungen in kDa nur schätzen.

21 kDa e

e	Einzelbanden, für die keine Gruppen erstellt werden
=	Doppelbande
()	Schwache Bande
+	Starke Bande

Westernblot-Urdatenblatt 4 für AmNA (Patient Nr. 1 bis 32)

Masse Bande Patient Nr.

	<u>e</u>	
	<u>6d</u>	(9)
	<u>8d</u>	(5)
<u>97 kDa</u>	<u>9d</u>	1+/(3)/8/(9)/(12)/(13)/(14)/(16)/17+/(18)/19/(20)/(21)/(23)/(26)/(27)/(29)/(31)
	<u>10d</u>	(12)
	<u>11d</u>	(16)/(19)
	<u>12d</u>	(16)/(27)
	<u>13d</u>	(3)/(12)/(26)/(31)
	<u>14d</u>	(5)/(26)
	<u>15d</u>	(16)/(17)
	<u>16d</u>	(3)
<u>67 kDa</u>	<u>17d</u>	3+/(17)
	<u>18d</u>	(1)/(17)/(19)/(27)/(28)
	<u>19d</u>	(12)/25+/27+/(28)
	<u>20d</u>	(3)/(5)/(14)/(17)/(18)/19+/(20)
	<u>21d</u>	1/(3)/10+/(12)/(31)
	<u>22d</u>	1/(19)/(20)
	<u>23d</u>	(10)/11/(19)
	<u>e</u>	
<u>45 kDa</u>	<u>25d</u>	3/11/(19)
	<u>26d</u>	(10)/(17)/(19)
	<u>27d</u>	
	<u>e</u>	
	<u>29d</u>	(16)/23+
	<u>30d</u>	(2)/(18)/(20)/(27)
	<u>31d</u>	3/(20)

29 kDa

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Nierenproteine der Maus (AmNA)

Definition der Fraktionen

6d, 8d-23d, 25d-27d, 29d-31d

(Antikörperfraktionen mit 2 und mehr Patienten)

Die Zahlen rechtsseitig des Bandenschemas entsprechen dem Patientencode.

Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode

ließen sich die molekularen Größenordnungen in kDa nur schätzen.

e 17

e (17)

21 kDa

e	Einzelbanden, für die keine Gruppen erstellt werden
=	Doppelbande
()	Schwache Bande
+	Starke Bande

Westernblot-Urdatenblatt 4 für AmNA (Patient Nr. 33 bis 57)

Masse Bande Patient Nr.

	<u> e </u>	(52)
	<u> 6d </u>	(52)
	<u> 8d </u>	(36)/(49)
97 kDa	<u> 9d </u>	(39)/(42)/(44)/(48)/50+/(52)/(55)
	<u> 10d </u>	(36)/(39)/(53)
	<u> 11d </u>	(53)
	<u> 12d </u>	
	<u> 13d </u>	(44)/(50)/52+
	<u> 14d </u>	(33)/44/(50)
	<u> 15d </u>	(40)
	<u> 16d </u>	(40)/(48)/(49)/(53)/(54)
67 kDa	<u> 17d </u>	(40)/(42)/(48)/(49)/(51)/(53)/(57)
	<u> 18d </u>	(42)/(43)/(44)/(50)/(51)/(55)
	<u> 19d </u>	40+/(43)/(54)
	<u> 20d </u>	(33)/35/(40)/45/46/50/(54)/(55)/(57)
	<u> 21d </u>	(33)/38/(39)/(49)/(50)52+/53/(54)/56+
	<u> 22d </u>	42/(44)
	<u> 23d </u>	(49)/(50)/(51)/(53)
	<u> e </u>	(55)
45 kDa	<u> 25d </u>	36/(39)/(50)/(53)
	<u> 26d </u>	
	<u> 27d </u>	(35)/(45)
	<u> e </u>	
	<u> 29d </u>	
	<u> 30d </u>	
	<u> 31d </u>	

29 kDa

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Nierenproteine der Maus (AmNA)

Definition der Fraktionen

6d, 8d-23d, 25d-27d, 29d-31d

(Antikörperfraktionen mit 2 und mehr Patienten)

Die Zahlen rechtsseitig des Bandenschemas entsprechen dem Patientencode.

Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode

ließen sich die molekularen Größenordnungen in kDa nur schätzen.

21 kDa

e	Einzelbanden, für die keine Gruppen erstellt werden
=	Doppelbande
()	Schwache Bande
+	Starke Bande

Bandenmuster für Hodenproteine der Maus (Patient Nr. 1 bis 19)

kDa	Patient Bande	Patient																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	/																			
	2a										1									
	3a																			
	4a									1	1					1				
	/																			
	6a								1	1	1		1							3
	/																			
	8a	2	1	2	1	3		1	1											
97	9a	2	1	2			1			1	1	1		1	1	1	1	1	1	3
	10a																			
	11a											1								1
	12a																			
	13a	2				3	1			1	1									
	14a					2														1
	15a																			
	16a																			
67	17a					1					1									
	18a									2										
	/																			
	20a																			1
	21a																			
	22a																			1
	23a																			
	/																			
45	25a														1					
	26a																			
	/																			
	28a																			
	29a	1	1	1																
	30a																			2
	/																			
	32a																			
	33a																			3
	/																			
29	/																			
	36a			2																
	/																			
	/																			

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande
- Kursiv* Doppelbande
- Parallele Bande in humanem Hodengewebe
- Parallele Bande in humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus
- Parallele Bande in humanem Hodengewebe und humanen Spermien

Bandenmuster für Hodenproteine der Maus (Patient Nr. 20 bis 38)

kDa	Patient Bande	Patient																		
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
	/																			
	2a	1		1					1			1								
	3a								2				1							
	4a	1	1		1		2				1		1	1					1	
	/																			
	6a	2	2	2	1	2		1	1	1			3	3	3	2		2		3
	/																			
	8a	2				1			1	1				1		1	1	1	1	1
97	9a		2	2	2			3	1	2	1		2	3	1	1	1		2	2
	10a					1														
	11a								1								2			
	12a																			
	13a				3			2		1			1							1
	14a							2		1			1	2	1	1	1			
	15a									3										
	16a				2				1		1									
67	17a	1					1	1	1	1		2		2	2					1
	18a	1		2		3				1			2				1			
	/																			
	20a								1	1					1					
	21a								1				3	1			2			1
	22a	2		1		3			3	1				1		1				1
	23a																			
	/																			
45	25a			1								1						3	1	
	26a																			
	/																			
	28a																			
	29a			1	1									1						
	30a			1										1						
	/																			
	32a									1										
	33a													1						
	/																			
29	/																			
	36a																			
	/																			
	/																			

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- | | | | |
|---------------|----------------|--|---|
| 1 | Schwache Bande | | Parallele Bande in humanem Hodengewebe |
| 2 | Normale Bande | | Parallele Bande in humanen Spermien |
| 3 | Starke Bande | | Parallele Bande in Hodengewebe der Maus |
| <i>Kursiv</i> | Doppelbände | | Parallele Bande in humanem Hodengewebe und humanen Spermien |

Bandenmuster für Hodenproteine der Maus (Patient Nr. 39 bis 57)

kDa	Patient Bande	Patient																		
		39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
	/																			
	2a																			
	3a		1							1										
	4a		1				1				3		1	1					1	
	/																			
	6a	3	2		3		1	3	3				2		1	2	2	3		
	/																			
	8a										2									
97	9a	1	1	1	1		3	3			1		3					1	3	
	10a	1									1									
	11a	1													1					
	12a										1									
	13a								1	1	1		2		3					
	14a					3	1						1							
	15a																			
	16a							1	3	1	1	2								
67	17a							1	2		1	1	1	1						
	18a													2						
	/																			
	20a																			1
	21a												2	1						
	22a			3	2		1			2			1			1	2			1
	23a												1	1						
	/																			
45	25a	1																		
	26a	1	2								1		2							
	/																			
	28a	1													1					
	29a																			
	30a																			
	/																			
	32a																			
	33a																			
	/																			
29	/																			
	36a																			
	/																			
	/																			

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- | | | | |
|---------------|----------------|--|---|
| 1 | Schwache Bande | | Parallele Bande in humanem Hodengewebe |
| 2 | Normale Bande | | Parallele Bande in humanen Spermien |
| 3 | Starke Bande | | Parallele Bande in Hodengewebe der Maus |
| <i>Kursiv</i> | Doppelbände | | Parallele Bande in humanem Hodengewebe und humanen Spermien |

Bandenmuster für humane Hodenproteine (Patient Nr. 1 bis 19)

kDa	Patient																				
	Bande		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	1b										1	2									
	2b										2	2	1				1				
	3b																				
	4b												3				1				
	/																				
	6b										1										
	7b												1								
	8b			2	1	3	1		1		1										
97	9b	2					2	2	1		2				2	3	2	1	2	3	3
	10b					1			1												1
	11b												3								
	12b			1		1															3
	13b					3	2				1			1							1
	14b			1								1						1			1
	15b																				
	16b						1														1
67	17b		3	1		1			1	2		1	2		1	2	3		3	2	
	18b												1								
	19b																				
	20b																				
	21b																				
	22b								1												
	23b											1									
	/																				
45	25b								1			1									1
	26b			3								1									
	27b																				
	28b										1		1	1				1			
	29b			1																	
	/																				
	/																				
	/																				
	/																				
	/																				
29	/																				
	36b	1																			
	/																				
	38b	1																			

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus. Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande
- Kursiv* Doppelbande
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus
- Parallele Bande in humanen Spermien
- Alleinige Bande in humanem Hodengewebe
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien

Bandenmuster für humane Hodenproteine (Patient Nr. 20 bis 38)

kDa	Patient Bande	Patient																		
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
	1b											1								
	2b																			
	3b																			
	4b												1				1			
	/																			
	6b								1						1					
	7b	3	1			1														
	8b								3					1				1		
97	9b	3	2	3		1	1	2	3	1	1		1	3	1	3	3		1	2
	10b										1	1			1					
	11b			1		1	2		2								1			1
	12b								1											
	13b						2	1	2	2	2	2	1				2		2	1
	14b					1		1	2	1				2	1					
	15b								2											
	16b								1								1			
67	17b	2						1	1	1	1		1	2	1				1	2
	18b			2					1	1							1			
	19b																			
	20b								1											
	21b																			
	22b							1				1								
	23b	1																		
	/																			
45	25b													1		1				
	26b								2	1	1	1				1				
	27b																			
	28b													1						
	29b																			
	/																			
	/																			
	/																			
	/																			
	/																			
29	/																			
	36b																			
	/																			
	38b																			

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- | | | | |
|---------------|----------------|---|--|
| 1 | Schwache Bande | | Parallele Bande in Hodengewebe der Maus |
| 2 | Normale Bande | | Parallele Bande in humanen Spermien |
| 3 | Starke Bande | | Alleinige Bande in humanem Hodengewebe |
| <i>Kursiv</i> | Doppelbände | | Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien |

Bandenmuster für humane Hodenproteine (Patient Nr. 39 bis 57)

kDa	Patient Bande	Patient																										
		39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57								
	1b						1					1	1		1	1			2									
	2b										1	1	1		1	2			1									
	3b										1					2												
	4b																											
	/																											
	6b									1																		
	7b																											
	8b											1																
	97	1	1	1	1	1	2	3	1		1	2	1				1	2	1	3								
	10b										1	1																
	11b						1			2						1	3	1		1								
	12b										1	1		1		3				1								
	13b			2	2			1		1	1	1	1		3		1	1		1								
	14b		1			1	1					1	1							1								
	15b						1									1	1											
	16b							1		1	1	2																
	67	1		1	1				2	1			1				1			1								
	18b					1				1	1	1								1								
	19b			1																1								
	20b						1																					
	21b		1												1			1	1									
	22b											1				1												
	23b		1						1	1		1	1		1				1	1								
	/																											
	45									1		1	1															
	26b	2		1	2		1			3	2		2	2		2	1	1		1								
	27b					2						1																
	28b		1						3						1													
	29b																											
	/																											
	/																											
	/																											
	/																											
	/																											
	29																											
	36b																											
	/																											
	38b																											

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande
- Kursiv* Doppelbande
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus
- Parallele Bande in humanen Spermien
- Alleinige Bande in humanem Hodengewebe
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien

Bandenmuster für humane Spermien (Patient Nr. 1 bis 19)

kDa	Patient Bande	Patient																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	1c																			
	2c																			
	3c																			
	4c											1								1
	5c															1		1		
	6c												2							2
	7c											1				1		1		
	8c			1			1	1	1			1				1		1		
97	9c	1		1				1	1				1		1		1		1	
	10c			1								1								
	11c																			
	12c							1	1	2				1						
	13c	1				3	1			1		1				2		1		
	14c								1			1		3		1				
	15c																			
	16c															3				
67	17c		1			1		1	2					1					1	1
	18c											1								
	/																			
	/																			
	21c																			
	22c																			
	23c																			
	/																			
45	25c																			
	26c														3					
	27c																			
	28c																			
	/																			
	/																			
	31c																			
	32c																			
	/																			
	34c											1								
29	35c																			
	36c	1	1	2																
	37c																			
	38c	1																		

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande
- Kursiv* Doppelbände
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus
- Parallele Bande in humanem Hodengewebe
- Alleinige Bande in humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanem Hodengewebe

Bandenmuster für humane Spermien (Patient Nr. 20 bis 38)

kDa	Patient																				
	Bande		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
	1c																				
	2c																				
	3c		2							3			1					1			
	4c			1				3					1							1	
	5c											1		1							
	6c		1				1	1		1			1		1	2					2
	7c			1					2	1											
	8c								2	1	1										
	9c		1					1	1	1				1	1	1	1				3
	10c		1																3	1	
	11c		1		1		1			1	1										
	12c		1		1	1		1	3		1			2	1	1	1	2			
	13c			1	2			2	2	1	1					1				1	1
	14c					2										2					1
	15c															1	1				
	16c																			1	
67	17c			2	1				3		3				2		1			1	1
	18c			1			2			1											
	/																				
	/																				
	21c																				
	22c			1													1				
	23c		1			1						1			1		1				
	/																				
45	25c																				
	26c		1							1											
	27c																				
	28c																				
	/																				
	/																				
	31c			1																	
	32c									1											
	/																				
	34c									1											
29	35c																				
	36c																				
	37c																	1			
	38c		1																		

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande
- Kursiv* Doppelbände
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus
- Parallele Bande in humanem Hodengewebe
- Alleinige Bande in humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanem Hodengewebe

Bandenmuster für Nierenproteine der Maus (Patient Nr. 1 bis 19)

kDa	Patient Bande	Patient																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	/																			
	/																			
	/																			
	4d																			
	/																			
	6d								1											
	/																			
	8d					1														
97	9d	3	1					2	1			1	1	1		1	3	1	2	
	10d											1								
	11d															1				1
	12d															1				
	13d			1								1								
	14d																			
	15d															1	1			
	16d			1																
67	17d			3														1		
	18d	1																1		1
	19d											1								
	20d			1		1								1			1	1	3	
	21d	2	1								3	1								
	22d	2																		1
	23d										1	2								1
	24d																			
45	25d			2								2								1
	26d										1							1		1
	27d																			
	28d																			
	29d																1			
	30d		1																1	
	31d			2																
	/																			
	/																			
	/																			
29	/																			
	/																			
	37d																	2		
	38d																	1		

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande

Kursiv Doppelbände

- Par. Bande in humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien

- Parallele Bande in humanem Hodengewebe und humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus, humanem Hodengewebe und humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus
- Parallele Bande in humanem Hodengewebe
- Alleinige Bande in Nierenproteine der Maus
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanem Hodengewebe

Bandenmuster für Nierenproteine der Maus (Patient Nr. 20 bis 38)

kDa	Patient Bande	Patient																		
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
	/																			
	/																			
	/																			
	4d																			
	/																			
	6d																			
	/																			
	8d																			1
97	9d	1	1		1			1	1		1		1							
	10d																			1
	11d																			
	12d									1										
	13d							1					1							
	14d							1							1					
	15d																			
	16d																			
67	17d																			
	18d								1	1										
	19d					3		3	1											
	20d	1												1		2				
	21d											1		1						2
	22d	1																		
	23d																			
	24d																			
45	25d																		2	
	26d																			
	27d																1			
	28d	1																		
	29d				3															
	30d	1							1											
	31d	1																		
	/																			
	/																			
	/																			
29	/																			
	/																			
	37d																			
	38d																			

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande

Kursiv Doppelbände

- Par. Bande in humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien

- Parallele Bande in humanem Hodengewebe und humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus, humanem Hodengewebe und humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus
- Parallele Bande in humanem Hodengewebe
- Alleinige Bande in Nierenproteine der Maus
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanem Hodengewebe

Bandenmuster für Nierenproteine der Maus (Patient Nr. 39 bis 57)

kDa	Patient Bande	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	
		/																			
/																					
/																					
4d															1						
/																					
6d															1						
/																					
8d												1									
97	9d	1			1		1				1		3		1			1			
	10d	1														1					
	11d															1					
	12d																				
	13d						1					1			3						
	14d						2					1									
	15d		1																		
	16d		1								1	1			1	1					
67	17d		1		1					1	1		1		1					1	
	18d				1	1	1					1	1					1			
	19d		3			1											1				
	20d		1					2	2				2				1	1			1
	21d	1									1	1			3	2	1			3	
	22d				2		1														
	23d											1	1	1		1					
	24d																	1			
45	25d	1											1		1						
	26d																				
	27d							1													
	28d																				
	29d																				
	30d																				
	31d																				
	/																				
	/																				
	/																				
29	/																				
	/																				
	37d																				
	38d																				

Gesamtverteilung der 57 Patienten mit Antikörpern gegen Hodenproteine der Maus.
 Aufgrund der Ungenauigkeit der Methode lassen sich die molekularen Größenordnungen nur schätzen.

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande

Kursiv Doppelbände

- Par. Bande in humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanen Spermien

- Parallele Bande in humanem Hodengewebe und humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus, humanem Hodengewebe und humanen Spermien
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus
- Parallele Bande in humanem Hodengewebe
- Alleinige Bande in Nierenproteine der Maus
- Parallele Bande in Hodengewebe der Maus und humanem Hodengewebe

Tab. 6: Statistische Werte der Banden für Hodenproteine der Maus

Bande	Summe der Bandenstärke	Mittelwert	Median	Standardabweichung
/	/	/	/	/
2a	5	1	1	0
3a	5	1,25	1	0,5
4a	20	1,176470588	1	0,52859414
/	/	/	/	/
6a	60	2	2	0,830454799
/	/	/	/	/
8a	22	1,375	1	0,619139187
9a	61	1,605263158	1	0,789781827
10a	3	1	1	0
11a	7	1,166666667	1	0,40824829
12a	1	1	1	ungültig
13a	24	1,6	1	0,828078671
14a	17	1,416666667	1	0,668557923
15a	3	3	3	ungültig
16a	12	1,5	1	0,755928946
17a	21	1,235294118	1	0,437237316
18a	14	1,75	2	0,707106781
/	/	/	/	/
20a	5	1	1	0
21a	11	1,571428571	1	0,786795792
22a	27	1,588235294	1	0,795206226
23a	2	1	1	0
/	/	/	/	/
25a	8	1,333333333	1	0,816496581
26a	6	1,5	1,5	0,577350269
/	/	/	/	/
28a	2	1	1	0
29a	6	1	1	0
30a	4	1,333333333	1	0,577350269
/	/	/	/	/
32a	1	1	1	ungültig
33a	4	2	2	1,414213562
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
36a	2	2	2	ungültig
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/

Tab. 7: Statistische Werte der Banden für humane Hodenproteine

Bande	Summe der Bandenstärke	Mittelwert	Median	Standardabweichung
1b	11	1,222222222	1	0,440958552
2b	13	1,3	1	0,483045892
3b	3	1,5	1,5	0,707106781
4b	6	1,5	1	1
/	/	/	/	/
6b	4	1	1	0
7b	6	1,5	1	1
8b	15	1,5	1	0,849836586
9b	78	1,813953488	2	0,823922498
10b	8	1	1	0
11b	20	1,538461538	1	0,776250026
12b	13	1,444444444	1	0,881917104
13b	40	1,538461538	1	0,646886032
14b	18	1,125	1	0,341565026
15b	5	1,25	1	0,5
16b	9	1,125	1	0,353553391
17b	44	1,466666667	1	0,681445387
18b	12	1,090909091	1	0,301511345
19b	2	1	1	0
20b	2	1	1	0
21b	4	1	1	0
22b	5	1	1	0
23b	10	1	1	0
/	/	/	/	/
25b	8	1	1	0
26b	30	1,578947368	1	0,692482609
27b	3	1,5	1,5	0,707106781
28b	10	1,25	1	0,707106781
29b	1	1	1	ungültig
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
36b	1	1	1	ungültig
/	/	/	/	/
38b	1	1	1	ungültig

Tab. 8: Statistische Werte der Banden für humane Spermien

Bande	Summe der Bandenstärke	Mittelwert	Median	Standarabweichung
1c	1	1	1	ungültig
2c	4	2	2	1,414213562
3c	12	1,5	1	0,755928946
4c	13	1,181818182	1	0,603022689
5c	4	1	1	0
6c	26	1,3	1	0,470162346
7c	12	1,090909091	1	0,301511345
8c	11	1,1	1	0,316227766
9c	30	1,111111111	1	0,423659273
10c	8	1,333333333	1	0,816496581
11c	5	1	1	0
12c	32	1,391304348	1	0,656376447
13c	35	1,4	1	0,645497224
14c	14	1,4	1	0,699205899
15c	2	1	1	0
16c	7	1,4	1	0,894427191
17c	24	1,411764706	1	0,71228712
18c	11	1,1	1	0,316227766
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
21c	3	1	1	0
22c	4	1	1	0
23c	14	1,166666667	1	0,577350269
/	/	/	/	/
25c	4	1	1	0
26c	12	1,2	1	0,632455532
27c	2	1	1	0
28c	4	1,333333333	1	0,577350269
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
31c	2	1	1	0
32c	2	1	1	0
/	/	/	/	/
34c	3	1	1	0
35c	4	1,333333333	1	0,577350269
36c	5	1,25	1	0,5
37c	2	1	1	0
38c	2	1	1	0

Tab. 9: Statistische Werte der Banden für Nierenproteine der Maus

Bande	Summe der Bandenstärke	Mittelwert	Median	Standarabweichung
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
4d	1	1	1	ungültig
/	/	/	/	/
6d	2	1	1	0
/	/	/	/	/
8d	3	1	1	0
9d	33	1,32	1	0,690410506
10d	4	1	1	0
11d	3	1	1	0
12d	2	1	1	0
13d	9	1,285714286	1	0,755928946
14d	6	1,2	1	0,447213595
15d	3	1	1	0
16d	6	1	1	0
17d	11	1,222222222	1	0,666666667
18d	11	1	1	0
19d	13	1,857142857	1	1,069044968
20d	22	1,375	1	0,619139187
21d	23	1,642857143	1	0,841897386
22d	7	1,4	1	0,547722558
23d	8	1,142857143	1	0,377964473
24d	1	1	1	ungültig
25d	10	1,428571429	1	0,534522484
26d	3	1	1	0
27d	2	1	1	0
28d	1	1	1	ungültig
29d	4	2	2	1,414213562
30d	4	1	1	0
31d	3	1,5	1,5	0,707106781
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
/	/	/	/	/
37d	2	2	2	ungültig
38d	1	1	1	ungültig

Tab. 10: Patientendaten (Patient Nr. 1 bis 23)

Patient Nr.	Anamnese, klinischer Befund
1	Nikotinkonsum von 1-2 Zigaretten-Packungen pro Tag; FSH-Spiegel pathologisch erhöht
2	Varicocele I.-II.° bds.; Z. n. Varicocelexenverödung; Hodentorsion rechts im Säuglingsalter
3	Maldescensus testis mit op. Therapie; rez. Prostatitis bek. (mit Antibiotika behandelt); Kinderwunsch seit > 10 Jahren
4	Toxoplasmoseinfektion im 18. Lebensjahr
5	Maldescensus testis rechts, Orchidopexie wurde erst im Alter von 10 J. durchgeführt; Mumps; Z. n. 4 x ICSI (kein Schwangerschaftseintritt)
6	Varicocele I.-II.° beidseits
7	Z. n. Embolisation einer Varicocele li.; Z. n. 1 x erfolgreicher ICSI-Behandlung und 2 x ohne Schwangerschaftseintritt
8	Varicocele I.-II.° rechts; Leisten-OP rechts mit 2 Jahren
9	Hodenprellung im 26. Lj.; Kinderwunsch seit 8 Jahren; Z. n. Padutin-Behandlung; Pendelhoden in der Jugend
10	Hormonbehandlung im Alter von ca. 12 Jahren wegen Maldescensus testis; Varicocele I.° links
11	Seit ca. 8 Jahren unerfüllter Kinderwunsch; Varicocele I.° links
12	Kryptorchismus beidseits in Kindheit; Varicocele I.-II.° rechts und II.-III.° links
13	Leichte diffuse tubuläre Hodenatrophie bds. (mit Hormonen behandelt); Varicocele II.° links; Z.n. IVF (von 9 entnommenen Eizellen wurden 3 befruchtet ohne Schwangerschaftseintritt)
14	Keine schwerwiegenden Vorerkrankungen; Varicocelexenuntersuchung ohne path. Befund
15	Mumps im Kindesalter, Varicocele 0.-I.° links, schwere Nierenentzündung im Alter von 7-8 Jahren
16	Mumps als Kleinkind; 1 eigenes Kind
17	Varicocele I.° rechts und II.° links
18	Maldescensus testis im Alter von 5 Jahren; Z. n. 1 x IVF mit Zona-Drilling, von 7 Eizellen wurden 2 befruchtet ohne Einnistung
19	Maldescensus testis bds. (links nach Hormonkur deszendiert, rechts OP im Alter von 4-6 Jahren); Varicocelexen-OP mit 14 Jahren; schwerer Testisschaden mit Spermatogenesestop und Übergang in Depopulationssyndrom
20	V.a. Maldescensus testis in der Kindheit
21	Z. n. Padutin- und Vitamin E-Behandlung Hypergonadotroper Hypogonadismus
22	Maldescensus testis re. (im Alter von 19 Jahren operiert); 1 eigenes Kind
23	Mumps

Tab. 10: Patientendaten (Patient Nr. 24 bis 45)

Patient Nr.	Anamnese, klinischer Befund
24	Typ I Sensibilisierung gegenüber Schimmelpilzen; Varicocele I.° links
25	Z. n. Hodenbiopsie bds. (Einschränkung der Spermatogenese); Z. n. HCG/HMG-Behandlung; Varicocele 0.-I.° beidseits
26	Z. n. Varicocelegenverödung links; Z. n. 2 x IVF und 1 x ICSI
27	Varicocele I.° links
28	seit 13 Jahren unerfüllter Kinderwunsch; Z. n. 3 Inseminationen und 2 IVF ohne Schwangerschaftseintritt
29	Maldescensus testis (mit 12 Jahren operiert); Varicocele I.-II.° beidseits; Mumps
30	Gleithoden als Kind; Mumps in Kindheit
31	3 Inseminationen ohne Schwangerschaftseintritt
32	Mumps in der Kindheit; Beruf: Chemikant (Industrieemission)
33	Kinderwunsch seit 3 Jahren; Mumps ohne Komplikationen in Kindheit; Hepatitis A bekannt; Varicocele II.-III.° links und 0.-I.° rechts
34	Pendelhodenfixation im 12. Lj.; Z. n. Hepatitis A- und B-Infektion; Z. n. Gonorrhöe, die antibiotisch behandelt wurde; Z. n. 1 x ICSI
35	Z. n. Tamoxifenbehandlung
36	Mumps in der Kindheit; beruflicher Lösungsmittelkontakt; Varicocele I.° links
37	Maldescensus testis (OP rechts); Z. n. Prostatitis; Varicocele I.° links; Z. n. 1 x Insemination und 4 x IVF und ICSI (im Rahmen der ICSI kam es zur Schwangerschaft, welche wegen Trisomie 21 in der 22.SSW abgebrochen wurde), Z. n. Herzklappen-OP, seither Einnahme von Marcumar & Beloc zoc mite
38	Kinderwunsch seit 10 Jahren; Z. n. 2 x Inseminationen (1 x Zwillingengeburt und 1 x erfolglos)
39	Mumps in der Kindheit; Varicocele I.° links
40	Circumcision mit 6 Jahren; Varicocele I.° links; Euthyreose
41	Mumps in der Kindheit; Psoriasis vulgaris; Einnahme von Teldane b. Bed. wegen einer Pollinose
42	Nebenhoden caudal links erweitert; Z. n. Varicocelegen-OP; Z. n. 1 x ICSI, Varicocele I.° links mit Begleithydrocele, Tegretal-Einnahme nach epileptischem Anfall, Euthyrox-Einnahme nach Schilddrüsen-OP
43	Hodentorsion im 18. Lj., welche operativ saniert wurde, seither bestehende Atrophie des re. Hodens; Mumps in Kindheit; Nikotinkonsum von 20 Zigaretten pro Tag
44	Z. n. Maldescensus testis; Orchidopexie mit 8 Jahren; Circumcision im Kindesalter
45	Frühere Therapie mit Zink; Nikotinkonsum 30 Zigaretten pro Tag

Tab. 10: Patientendaten (Patient Nr. 46 bis 57)

Patient Nr.	Anamnese, klinischer Befund
46	Varicocele I.° links
47	Kinderwunsch seit mehr als 7 Jahren; Varicocele I.° links; Z. n. 4 x Inseminationen
48	OAT-Syndrom bekannt
49	Circumcision in der Kindheit; Nikotinkonsum 20 Zigaretten pro Tag
50	Benigne Prostatahyperplasie; Kinderwunsch seit 20 Jahren; Z. n. 2 Varicoceleen-OP im Erwachsenenalter links; Z. n. 3 x IVF (Eizellen wurden bei jeder befruchtet ohne Schwangerschaftseintritt); Z. n. Padutinbehandlung
51	Z. n. mehreren Inseminationen, Z. n. 1 x IVF (8 Eizellen wurden entnommen, es erfolgte keine Befruchtung) beruflicher Kontakt mit Chemikalien und Lösungsmitteln; Nikotinkonsum 20 Zigaretten pro Tag
52	Celenartige Absetzung im Mittelstück des rechten Nebenhodens; 1 eigenes Kind; gelegentl. Alkoholkonsum, Knochenprobleme, Arthrose, daher häufig radiolog. Untersuchungen, Einnahme von Diclofenac n. Bed.; Z. n. antimykot. Behandlung wg. Pilzbesiedelung im Halsbereich, berufl. Lösungsmittelkontakt; Nikotinkonsum 20 Zigaretten/Tag
53	Leistenhernien-OP im Alter von 8 Jahren; Varicoceleen-OP vor 5-6 Jahren; latenter Diabetes mellitus
54	Varicocele 0.-I.° links; beidseits Intertrigo in der Leiste; Kinderwunsch seit 3 Jahren; Adipositas per magna; Hypertonie; gelegentlicher Alkoholkonsum
55	Varicocele 0.-I.° beidseits; Psoriasis vulgaris seit dem 15. Lj.
56	Z. n. Varicoceleen-OP links; Euthyreose
57	Varicocele I.° links; Z. n. Padutintherapie; Nikotinkonsum 20 Zigaretten pro Tag

Tab. 11: Spermogramm (Patient Nr. 1 bis 30)

Patient Nr.	Spermogramm									
	Karenz	Volumen (ml)	pH-Wert	Motilität % Gesamt	(a) schnell	(b) langsam	(c) lokal	(d) keine		
1	4 d	0,5	7,7	54%	3%	23%	28%	46%		
2	5 d	5,1	7,5	18%	2%	5%	11%	82%		
3	4 d	2	7,5	58%	1%	18%	39%	42%		
4	3 d	2,3	7,5	59%	27%	18%	14%	41%		
5	6 d	4	7,7	11%	3%	2%	6%	89%		
6	14 d	7	7,5	37%	2%	11%	24%	63%		
7	6 d	6,5	7,5	12%	2%	4%	6%	88%		
8	4 d	4,1	7,5	61%	17%	27%	17%	39%		
9	7 d	5	7,5	58%	20%	19%	19%	42%		
10	7 d	2,7	7,5	55%	8%	26%	21%	45%		
11	4 d	3	7,7	58%	15%	26%	17%	42%		
12	3 d	4,9	7,5	51%	7%	17%	27%	49%		
13	3 d	2,3	7,5	2 unbewegliche Spermien gesehen						
14	3 d	0,9	7,7	1 unbewegliches Spermium gesehen						
15	8 d	3	7,5	50%	12%	21%	17%	50%		
16	5 d	2,5	7,5	50%	10%	19%	21%	50%		
17	7 d	2	7,5	64%	2%	10%	34%	54%		
18	5 d	2,7	7,5	45%	10%	15%	20%	55%		
19	10 d	4,7	7,2	1 bewegliches Spermium gesehen						
20	4 d	4,3	7,7	26%	4%	12%	10%	74%		
21	6 d	2,8	7,5	keine Spermien gesehen						
22	4 d	4,6	7,2	77%	19%	38%	20%	23%		
23	5 d	2,8	7,5	62%	24%	22%	16%	38%		
24	3 d	2,6	7,5	66%	24%	26%	16%	34%		
25	4 d	5,1	7,5	54 Spermien gesehen (1 langsame Motilität, 1lokale						
26	4 d	4,9	7,2	3 Spermien gesehen (1lokale Motilität, 2 keine Motilität)						
27		3,9	7,5	34%	3%	14%	17%	66%		
28	4 d	2,8	7,5	48%	3%	26%	19%	52%		
29	2 d	3,1	7,5	60%	21%	16%	23%	40%		
30	3 d	2,5	7,7	43%	19%	14%	10%	57%		

Tab. 11: Spermogramm (Patient Nr. 31 bis 57)

Patient Nr.	Spermogramm							
	Karenz	Volumen (ml)	pH-Wert	Motilität % Gesamt	(a) schnell	(b) langsam	(c) lokal	(d) keine
31	5 d	1,5	7,7	13%	/	4%	9%	87%
32	5 d	7,5	7,5	47%	13%	20%	14%	53%
33	5 d	4,8	7,2	55%	18%	21%	16%	45%
34	8 d	3	7,5	61%	15%	26%	20%	39%
35	5 d	2,6	7,5	45%	4%	16%	25%	55%
36	5 d	4,8	7,5	25%	6%	8%	11%	75%
37	4 d	5,4	7,2	60%	11%	20%	29%	40%
38	5 d	6,3	7,7	45%	12%	18%	15%	55%
39	4 d	9,7	7,5	69%	16%	29%	24%	31%
40	21 d	3,8	7,5	43%	11%	18%	14%	57%
41	5 d	2,5	7,5	64%	27%	21%	16%	36%
42	5 d	9	7,2	55%	7%	23%	25%	45%
43	4 d	2,6	7,5	62%	15%	26%	21%	38%
44	5 d	1,9	7,7	58%	17%	26%	15%	42%
45	6 d	4,1	7,5	43%	6%	22%	15%	57%
46	5 d	4,7	7,5	56%	15%	24%	17%	44%
47	8 d	3,2	7,2	51%	16%	19%	16%	49%
48	5 d	1,4	7,5	13%	1%	4%	8%	87%
49	2 d	3,8	7,7	65%	18%	28%	19%	35%
50	6 d	2,9	7,5	41%	9%	18%	14%	59%
51	7 d	4,4	7,5	58%	19%	21%	18%	42%
52	5 d	3	7,5	59%	12%	25%	22%	41%
53	5 d	2,4	7,5	46%	3%	16%	27%	54%
54	8 d	4,5	7,5	47%	3%	24%	20%	53%
55	8 d	5	7,5	53%	21%	17%	15%	47%
56	3 d	2,8	8	47%	6%	19%	22%	53%
57	8 d	7,1	7,5	53%	/	7%	46%	47%

Tab. 12: Spermogramm Fortführung (Patient Nr. 1 bis 30)

Patient Nr.	Spermogramm					
	Zahl der Spermien (Mio./ml)	Morphologie normal in %	Leukozyten	Agglutination	Makrophagen	Eosin % vital
1	2,81	24%	(+)	/	/	73%
2	0,62	/	++	/	(+)	88%
3	110,9	39%	/	+	/	67%
4	29,6	3%	+++	/	+	79%
5	< 0,31	/	++	/	/	1 vitales
6	125	18%	/	+++	/	68%
7	0,93	/	(+)	/	/	50%
8	30,6	10%	/	/	/	81%
9	7,13	1%				75%
10	0,31	3%	+	/	/	73%
11	63,4	26%	/	+++	/	74%
12	0,31	9%	++	/	/	70%
13	< 0,31	/	/	/	/	/
14	< 0,31	*	++			
15	49,1	22%	++			71%
16	34,3	23%	/	++	/	70%
17	0,31	/, da nur 13 Spermien gesehen	(+)		++	50%
18	15	4%	/	/	/	73%
19	< 0,31	/	/	/	/	/
20	2,5	/	++	/	/	71%
21	/	/	+	/	/	/
22	13,7	5%	/	/	/	83%
23	156,2	13%	/	++	/	78%
24	92,1	40%		+		83%
25	< 0,31	0 – 1%				1 vitales
26	< 0,31	/	++	/	/	/
27	7,45	5%	+			78%
28	11,5	/	++			67%
29	16,9	18%	/	+	/	69%
30	23,1	3%	+	/	/	68%

* Morphologie bei 2 Spermatozoen gesehen, wobei 1 mit Akrosomenstörung, 1 mit Überstreckung

Tab. 12: Spermogramm Fortführung (Patient Nr. 31 bis 57)

Patient Nr.	Spermogramm					
	Zahl der Spermien (Mio./ml)	Morphologie normal in %	Leukozyten	Agglutination	Makrophagen	Eosin % vital
31	3,41	/				
32	28,7	12%	/	/	/	74%
33	36,7	18%	+	+		78%
34	16,9	31%	/	+	/	75%
35	31,2	6%	(+)	+	/	70%
36	2,81	4%	/	/	/	78%
37	4,03	10%	/	/	/	81%
38	16,2	6%	/	/	/	80%
39	18,6	35%	/	+++	/	75%
40	82,5	2%	/	+++	/	59%
41	39,7	12%	/	/	/	74%
42	3,1	1%	+	/	/	59%
43	21,8	5%	++		(+)	77%
44	15	2%	/	/	/	76%
45	65,6	9%	/	+	/	73%
46	19,5	1%	/	+	/	85%
47	41,2	4%	/	++	/	76%
48	1,56	/	++			69%
49	12,5	2%	/	+	/	83%
50	50	7%	/	+++	/	55%
51	25,6	/	/	++	/	69%
52	3,75	/	++			68%
53	2,81	2%	/	/	/	70%
54	0,93	/	++			79%
55	29,9	1%	+(+)	+		62%

Tab. 13: ELISA, Prolaktin, Inhibin (Patient Nr. 1 bis 30)

Patient Nr.	Alter	ELISA			Prolaktin (ng/ml)	Inhibin (ng/ml)
		Chlamydien IgA	Serum AK (U/ml)	IL 6 (pg/ml)		
1	31	neg.	12,6	48	12,7	17
2	31	neg.	4	62	6,7	75
3	41	neg.	> 100	57	11,9	122
4	43	neg.	5	431	7,6	166
5	44	neg.	13	69	9,7	62
6	38	neg.	2	19	9,6	197
7	36	neg.	9	11	24,7	35
8	34	neg.	> 100	11	10,7	53
9	36	neg.	6	20	12,5	118
10	40	neg.	10	123	9,3	< 15
11	37	neg.	> 100	17	3,4	163
12	41	++	< 1,5	87	10,6	49
13	35	neg.	2	10	12,4	34
14	31		8	289	8,4	129
15	32	neg.	18	16	2,5	132
16	33	neg.	5	6	5,4	147
17	42	neg.	8,2	7	10,5	
18	34	neg.	6	14	7,9	153
19	35	neg.	3	39	8,7	39
20	29	neg.	13	327	13,6	108
21	31	neg.	> 100	31	6,4	< 15
22	35	neg.	49	51	12,8	84
23	30	neg.	4	10	8,7	175
24	38	neg.	6	142	11,7	
25	40	neg.	2	12	6,7	
26	37	neg.	4	19	11,2	25
27	30	neg.	5	19	10	194
28	33	neg.	2	7	9,8	190
29	27	neg.	4	18	13,5	121
30	41	neg.	25	41	13	21

Tab. 13: ELISA, Prolaktin, Inhibin (Patient Nr. 31 bis 57)

Patient Nr.	Alter	ELISA			Prolaktin (ng/ml)	Inhibin (ng/ml)
		Chlamydien IgA	Serum AK (U/ml)	IL 6 (pg/ml)		
31	32				7	
32	34	neg.	3,7	16	6,8	145
33	31	neg.	4,4	8	13,5	87
34	29	++	18,4	67	8,6	87
35	32	+	4	10	8,2	171
36	26	neg.	11	52	6,1	134
37	36	neg.	> 100	24	6,5	78
38	43	neg.	24	35	8,6	195
39	30	neg.	4	27	6,8	153
40	36	neg.	15	33	6,2	216
41	32	neg.	97	15	5,4	102
42	35	neg.	5	28	11,4	151
43	23	++++	16	70	13,1	48
44	33	neg.	10	34	11,9	114
45	33	neg.	13	70	6,3	224
46	30	neg.	10	/	8,6	195
47	39	neg.	7	15	6,8	223
48	29	neg.	3	67	11,4	157
49	34	neg.	78	4	9,4	218
50	44	neg.	2	67	5,5	217
51	31	neg.	1	24	8	156
52	38	neg.	2	53	5,3	190
53	42	neg.	9	38	13,2	99
54	38	neg.	3	32	8,5	31
55	37	neg.	2	12	8,9	138
56	34	neg.	14	373	7,1	69
57	31	neg.	9	4	7,9	159

Tab. 14: Mikrobiologie des Ejakulats (Patient Nr. 1 bis 30)

Patient Nr.	Mikrobiologie des Ejakulates
1	Koagulase-neg. Staphylokokken: ++
2	Kein aerobes Wachstum
3	Koagulase-neg. Staphylokokken: 5×10^4 K/ml, Streptokokken ohne Gruppen-AG: 1×10^4 K/ml
4	Koagulase-neg. Staphylokokken: 1 Kol.
5	Beachtliche Überwucherung mit Ureaplasma urealyticum und Neisseria gonorrh.
6	Koagulase-neg. Staphylokokken: (+)
7	Kein aerobes Wachstum
8	Streptokokken ohne Gruppenantigen: 2×10^3 K/ml
9	Koagulase-neg. Staphylokokken: 2 Kol., Ureaplasma urealyticum: ++
10	Enterokokken: 1×10^3 K/ml
11	Koagulase-neg. Staphylokokken: 2×10^3 K/ml
12	Kein aerobes Wachstum
13	Koagulase-neg. Staphylokokken: (+), Enterokokken: 3 Kol.
14	Koagulase-neg. Staphylokokken: (+)
15	E. coli: $> 10^4$ K/ml
16	Koagulase-neg. Staphylokokken: (+)
17	Koagulase-neg. Staphylokokken: (+)
18	Koagulase-neg. Staphylokokken: (+)
19	Koagulase-neg. Staphylokokken: 1 Kol.
20	Koagulase-neg. Staphylokokken: (+), E. coli.: +
21	Koagulase-neg. Staphylokokken: 2×10^3 K/ml
22	Koagulase-neg. Staphylokokken: 2×10^3 K/ml
23	Kein aerobes Wachstum
24	Gram.-neg. Stäbchen: 2 Kol.
25	Koagulase-neg. Staphylokokken: 2×10^3 K/ml, Streptokokken ohne Gruppen-AG: 3×10^4 K/ml
26	Koagulase-neg. Staphylokokken: 1 Kol.
27	Enterokokken: 2×10^4 K/ml
28	Koagulase-neg. Staphylokokken: 4×10^3 K/ml
29	Kein aerobes Wachstum
30	Streptokokken der Gruppe B: +++++

Tab. 14: Mikrobiologie des Ejakulats (Patient Nr. 31 bis 57)

Patient Nr.	Mikrobiologie des Ejakulates
31	Koagulase-neg. Staphylokokken: 4 Kol.
32	Koagulase-neg. Staphylokokken: 1 Kol.
33	Vergrünende Streptokokken: 1×10^3 K/ml
34	Koagulase-neg. Staphylokokken: 1×10^3 K/ml
35	Kein aerobes Wachstum
36	Koagulase-neg. Staphylokokken: 2 Kol., Vergrünende Streptokokken: 1×10^3 K/ml
37	Koagulase-neg. Staphylokokken: 2 Kol., Vergrünende Streptokokken: 1×10^3 K/ml
38	Vergrünende Streptokokken: 4×10^4 K/ml
39	Koagulase-neg. Staphylokokken: 4×10^3 K/ml, Enterokokken 4×10^3 K/ml
40	Vergrünende Streptokokken: 3×10^4 K/ml, Ureaplasma urealyticum: ++
41	Kein aerobes Wachstum
42	Koagulase-neg. Staphylokokken: 1×10^3 K/ml, Ureaplasma urealyticum: ++
43	Koagulase-neg. Staphylokokken: 5×10^4 K/ml
44	Koagulase-neg. Staphylokokken: 1×10^3 K/ml
45	Vergrünende Streptokokken: 1×10^3 K/ml
46	Vergrünende Streptokokken: (+)
47	Vergrünende Streptokokken: 2×10^3 K/ml
48	Koagulase-neg. Staphylokokken: ++
49	Staphylococcus aureus: (+)
50	Koagulase-neg. Staphylokokken: 4×10^3 K/ml
51	Koagulase-neg. Staphylokokken: (+)
52	Koagulase-neg. Staphylokokken: +
53	Koagulase-neg. Staphylokokken: (+)
54	Koagulase-neg. Staphylokokken: 1 Kol., Ureaplasma urealytic.: +, Mycoplasma spec.: +++
55	Koagulase-neg. Staphylokokken: +, Ureaplasma urealyticum: +
56	Koagulase-neg. Staphylokokken: 2 Kol.
57	Vergrünende Streptokokken: (+), Staphylococcus aureus: 2 Kol.

Tab. 15: Banden im Westernblot (Patient Nr. 1 bis 30)

Patient Nr.	Banden im Westernblot																					
	6a	6b	6c	8a	8b	8c	9a	9b	9c	13a	13b	13c	17a	17b	17c	22a	22b	22c	26a	26b	26c	
1				2			2 =	2 =	1	2		1										
2				1			1							3 =	1							
3				2	2	1	2		1					1 =						3 =		
4				1	1 =																	
5				3 =	3 =					3	3	3	1	1 =	1							
6					1	1	1	2 =		1	2 =	1										
7	1			1		1		2 =	1					1 =	1		1					
8	1			1	1	1		1 =	1					2 =	2							
9	1						1			1	1	1										
10		1			1		1	2		1			1	1						1		
11	1						1					1		2								
12						1					1 =											
13			2 =				1	2 =	1					1 =	1 =							
14							1	3 =						2 =							3	
15							1	2 =						3 =								
16						1	1	1 =	1			2 =										
17							1	2 =						3 =								
18							1	3 =	1			1		2 =	1							
19	3		2 =				3	3 =			1 =			1	1							
20	2		1	2				3	1				1	2 =		2					1	
21	2						2	2										1				
22	2						2 =	3 =				1			2	1 =						
23	1						2			3	2			1								
24	2		1	1				1								3						
25			1					1 =	1		2	2	1									
26	1					2	3 =	2 =	1	2	1	2	1	1	3		1					
27	1		1 =	1	3	1 =	1	3 =	1 =		2 =	1 =	1	1		3 =				2 =	1	
28	1	1		1		1	2 =	1		1	2 =	1	1	1	3	1				1		
29							1	1			2 =			1							1	
30											2 =		2								1	

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande
- = Doppelbande

Tab. 15: Banden im Westernblot (Patient Nr. 31 bis 57)

Patient Nr.	Banden im Westernblot																				
	6a	6b	6c	8a	8b	8c	9a	9b	9c	13a	13b	13c	17a	17b	17c	22a	22b	22c	26a	26b	26c
31	3		1				2	1	1	1	1=		1			1					
32	3						3=	3=	1				2	2	2	1					
33	3		1	1	1		1	1	1			1	2	1							
34	2=	1	2				1	3=	1						1	1		1=			
35				1			1	3				2=									1=
36	2			1=	1=																
37				1			2	1=				2=	1		1=	1					
38	3		2				2=	2=	3	1=	1=	1	1	2=	1	1					
39	3		1				1	1	1					1					1	2=	
40	2		1				1	1=	1										2		
41			1				1	1	1			2=	2		1	3				1	
42	3						1	1	1			2=	1		1	2				2=	
43								1=													
44	1					1	3	2=								1				1=	
45	3=		1				3	3=	1		1	2=	1								
46	3	1						1=		1			2	2=							
47										1	1=	1		1		2				3=	1
48			1				1	1	1	1	1	1	1						1	2=	1
49			1	2	1			2			1	1	1								
50	2=		1				3=	1		2=	1=		1	1		1	1		2	2=	1
51			2						1				1							2=	1
52	1								1	3=	3=	3=			1						
53	2		2=													1		1		2=	1
54	2		1=					1	1=		1=	1=		1	1	2	1			1=	1
55	3						1	2=			1=									1	
56							3	1	1			1		1				1			
57								3=	2		1					1				1=	1

Zeichenerklärung

- 1 Schwache Bande
- 2 Normale Bande
- 3 Starke Bande
- = Doppelbande

Tab. 16: Immunfluoreszenz, Immunobead (Patient Nr. 1 bis 30)

Patient Nr.	Immunfluoreszenz	Immunobead
1	Negativ	Negativ
2	Negativ	Negativ
3	Negativ	Negativ
4	Negativ	Negativ
5	Negativ	Negativ
6	Negativ	Negativ
7	Negativ	Negativ
8	Negativ	Negativ
9	Negativ	Negativ
10	Negativ	Negativ
11	Negativ	Positiv
12	Negativ	Negativ
13	Negativ	Negativ
14	Negativ	Negativ
15	Negativ	Negativ
16	Negativ	Negativ
17	Negativ	Negativ
18	Negativ	Negativ
19	Negativ	Negativ
20	Negativ	Negativ
21	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
22	Negativ	Positiv
23	Negativ	Negativ
24	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
25	Negativ	Negativ
26	Fluoreszenz um Schwanz und Kopf	Negativ
27	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
28	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
29	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
30	Negativ	Negativ

Tab. 16: Immunfluoreszenz, Immunobead (Patient Nr. 31 bis 57)

Patient Nr.	Immunfluoreszenz	Immunobead
31	Negativ	Negativ
32	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
33	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
34	Fluoreszenz um Schwanz und Kopf	Negativ
35	Fluoreszenz um Schwanz	Positiv
36	Negativ	Negativ
37	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
38	Negativ	Negativ
39	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
40	Negativ	Negativ
41	Negativ	Negativ
42	Negativ	Negativ
43	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
44	Negativ	Negativ
45	Negativ	Negativ
46	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
47	Negativ	Negativ
48	Fluoreszenz um Äquatorialequator	Negativ
49	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
50	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
51	Negativ	Negativ
52	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
53	Negativ	Negativ
54	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
55	Negativ	Negativ
56	Fluoreszenz um Schwanz	Negativ
57	Negativ	Negativ

Tab. 17: Patienten mit Antikörperreaktionen (Patient Nr. 1 bis 30)

Patient Nr.	ELISA			Bande für humane Hodenproteine	Bande für humane Spermien	Immunfluoreszenz	Immuno-bead
	Chlamydien IgA	Serumantikörper (U/ml)	IL 6 (pg/ml)				
1	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
2	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
3	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
4	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.
5	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
6	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
7	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
8	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
9	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
10	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.
11	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	pos.
12	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.
13	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
14		neg.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.
15	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.
16	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
17	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.
18	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
19	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
20	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.
21	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
22	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	pos.
23	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.
24	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
25	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
26	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
27	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
28	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
29	neg.	neg.	neg.	pos.	pos. (neg.)	pos.	neg.
30	neg.	pos.	neg.	pos.	pos. (neg.)	neg.	neg.

Legende: In Klammern steht das Ergebnis für die als relevant betrachteten Banden

Tab. 17: Patienten mit Antikörperreaktionen (Patient Nr. 31 bis 57)

Patient Nr.	ELISA			Bande für humane Hodenproteine	Bande für humane Spermien	Immunfluoreszenz	Immuno-bead
	Chlamydien IgA	Serumantikörper (U/ml)	IL 6 (pg/ml)				
31				pos.	pos.	neg.	neg.
32	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
33	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
34	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
35	pos.	neg.	neg.	pos.	pos. (neg.)	pos.	pos.
36	neg.	neg.	neg.	pos.	pos. (neg.)	neg.	neg.
37	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
38	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
39	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
40	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
41	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
42	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
43	pos.	neg.	pos.	pos.	pos. (neg.)	pos.	neg.
44	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
45	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.
46	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
47	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
48	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
49	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
50	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
51	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
52	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
53	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.
54	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
55	neg.	neg.	neg.	pos.	pos. (neg.)	neg.	neg.
56	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
57	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.

Legende: In Klammern steht das Ergebnis für die als relevant betrachteten Banden

Tab. 18: Korrelationstabelle

Merkmal A	Merkmal B	Korrelation
Alter ≤ 30 Jahre	Serumantikörper (ELISA)	nein
Alter ≥ 41 Jahre	Serumantikörper (ELISA)	nein
Alter 31 - 35 Jahre	Serumantikörper (ELISA)	nein
Alter 36 - 40 Jahre	Serumantikörper (ELISA)	nein
IL 6 (ELISA)	Serumantikörper (ELISA)	nein
IL 6 (ELISA)	Immunfluoreszenz	nein
IL 6 (ELISA)	Immunobeadassay	nein
Immunfluoreszenz	Immunobeadassay	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Agglutination	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Bande 6 Hodenproteine der Maus	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Bande 6 humane Spermien	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Chlamydien IgA (ELISA)	ja
Bande 6 humane Hodenproteine	Eosin niedrig	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Hodentorsion	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Immunfluoreszenz	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Immunobeadassay	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Inhibin niedrig	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Lageanomalie	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Leukozyten	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Makrophagen	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Morphologie	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Motilität niedrig	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Mumps	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Prolaktin hoch	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Prolaktin niedrig	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Varicocele	nein
Bande 6 humane Hodenproteine	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 6 humane Spermien	Agglutination	nein
Bande 6 humane Spermien	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 6 humane Spermien	Eosin niedrig	nein
Bande 6 humane Spermien	Hodentorsion	nein
Bande 6 humane Spermien	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 6 humane Spermien	Immunfluoreszenz	nein
Bande 6 humane Spermien	Immunobeadassay	nein
Bande 6 humane Spermien	Inhibin niedrig	nein
Bande 6 humane Spermien	Lageanomalie	nein
Bande 6 humane Spermien	Leukozyten	nein
Bande 6 humane Spermien	Makrophagen	nein
Bande 6 humane Spermien	Morphologie	nein
Bande 6 humane Spermien	Motilität niedrig	nein
Bande 6 humane Spermien	Mumps	nein
Bande 6 humane Spermien	Prolaktin hoch	nein

Merkmal A	Merkmal B	Korrelation
Bande 6 humane Spermien	Prolaktin niedrig	nein
Bande 6 humane Spermien	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 6 humane Spermien	Varicocele	nein
Bande 6 humane Spermien	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Agglutination	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Bande 8 Hodenproteine der Maus	ja
Bande 8 humane Hodenproteine	Bande 8 humane Spermien	ja
Bande 8 humane Hodenproteine	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Eosin niedrig	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Hodentorsion	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Immunfluoreszenz	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Immunobeadassay	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Inhibin niedrig	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Lageanomalie	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Leukozyten	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Makrophagen	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Morphologie	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Motilität niedrig	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Mumps	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Prolaktin hoch	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Prolaktin niedrig	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Varicocele	nein
Bande 8 humane Hodenproteine	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 8 humane Spermien	Agglutination	nein
Bande 8 humane Spermien	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 8 humane Spermien	Eosin niedrig	nein
Bande 8 humane Spermien	Hodentorsion	nein
Bande 8 humane Spermien	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 8 humane Spermien	Immunfluoreszenz	nein
Bande 8 humane Spermien	Immunobeadassay	nein
Bande 8 humane Spermien	Inhibin niedrig	nein
Bande 8 humane Spermien	Lageanomalie	nein
Bande 8 humane Spermien	Leukozyten	nein
Bande 8 humane Spermien	Makrophagen	nein
Bande 8 humane Spermien	Morphologie	nein
Bande 8 humane Spermien	Motilität niedrig	nein
Bande 8 humane Spermien	Mumps	nein
Bande 8 humane Spermien	Prolaktin hoch	nein
Bande 8 humane Spermien	Prolaktin niedrig	nein
Bande 8 humane Spermien	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 8 humane Spermien	Varicocele	nein
Bande 8 humane Spermien	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Agglutination	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Bande 9 Hodenproteine der Maus	ja

Merkmal A	Merkmal B	Korrelation
Bande 9 humane Hodenproteine	Bande 9 humane Spermien	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Eosin niedrig	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Hodentorsion	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Immunfluoreszenz	ja
Bande 9 humane Hodenproteine	Immunobeadassay	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Inhibin niedrig	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Lageanomalie	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Leukozyten	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Makrophagen	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Morphologie	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Motilität niedrig	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Mumps	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Prolaktin hoch	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Prolaktin niedrig	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Varicocele	nein
Bande 9 humane Hodenproteine	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 9 humane Spermien	Agglutination	nein
Bande 9 humane Spermien	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 9 humane Spermien	Eosin niedrig	nein
Bande 9 humane Spermien	Hodentorsion	nein
Bande 9 humane Spermien	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 9 humane Spermien	Immunfluoreszenz	nein
Bande 9 humane Spermien	Immunobeadassay	nein
Bande 9 humane Spermien	Inhibin niedrig	nein
Bande 9 humane Spermien	Lageanomalie	nein
Bande 9 humane Spermien	Leukozyten	nein
Bande 9 humane Spermien	Makrophagen	nein
Bande 9 humane Spermien	Morphologie	nein
Bande 9 humane Spermien	Motilität niedrig	nein
Bande 9 humane Spermien	Mumps	nein
Bande 9 humane Spermien	Prolaktin hoch	nein
Bande 9 humane Spermien	Prolaktin niedrig	nein
Bande 9 humane Spermien	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 9 humane Spermien	Varicocele	nein
Bande 9 humane Spermien	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Agglutination	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Bande 13 Hodenproteine der Maus	ja
Bande 13 humane Hodenproteine	Bande 13 humane Spermien	ja
Bande 13 humane Hodenproteine	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Eosin niedrig	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Hodentorsion	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Immunfluoreszenz	nein

Merkmal A	Merkmal B	Korrelation
Bande 13 humane Hodenproteine	Immunobeadassay	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Inhibin niedrig	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Lageanomalie	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Leukozyten	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Makrophagen	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Morphologie	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Motilität niedrig	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Mumps	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Prolaktin hoch	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Prolaktin niedrig	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Varicocele	nein
Bande 13 humane Hodenproteine	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 13 humane Spermien	Agglutination	nein
Bande 13 humane Spermien	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 13 humane Spermien	Eosin niedrig	nein
Bande 13 humane Spermien	Hodentorsion	nein
Bande 13 humane Spermien	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 13 humane Spermien	Immunfluoreszenz	nein
Bande 13 humane Spermien	Immunobeadassay	nein
Bande 13 humane Spermien	Inhibin niedrig	nein
Bande 13 humane Spermien	Lageanomalie	nein
Bande 13 humane Spermien	Leukozyten	nein
Bande 13 humane Spermien	Makrophagen	nein
Bande 13 humane Spermien	Morphologie	nein
Bande 13 humane Spermien	Motilität niedrig	nein
Bande 13 humane Spermien	Mumps	nein
Bande 13 humane Spermien	Prolaktin hoch	nein
Bande 13 humane Spermien	Prolaktin niedrig	nein
Bande 13 humane Spermien	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 13 humane Spermien	Varicocele	nein
Bande 13 humane Spermien	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Agglutination	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Bande 17 Hodenproteine der Maus	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Bande 17 humane Spermien	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Eosin niedrig	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Hodentorsion	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Immunfluoreszenz	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Immunobeadassay	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Inhibin niedrig	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Lageanomalie	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Leukozyten	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Makrophagen	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Morphologie	nein

Merkmal A	Merkmal B	Korrelation
Bande 17 humane Hodenproteine	Motilität niedrig	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Mumps	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Prolaktin hoch	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Prolaktin niedrig	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 17 humane Hodenproteine	Varicocele	ja
Bande 17 humane Hodenproteine	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 17 humane Spermien	Agglutination	ja
Bande 17 humane Spermien	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 17 humane Spermien	Eosin niedrig	nein
Bande 17 humane Spermien	Hodentorsion	nein
Bande 17 humane Spermien	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 17 humane Spermien	Immunfluoreszenz	nein
Bande 17 humane Spermien	Immunobeadassay	nein
Bande 17 humane Spermien	Inhibin niedrig	ja
Bande 17 humane Spermien	Lageanomalie	nein
Bande 17 humane Spermien	Leukozyten	nein
Bande 17 humane Spermien	Makrophagen	nein
Bande 17 humane Spermien	Morphologie	nein
Bande 17 humane Spermien	Motilität niedrig	nein
Bande 17 humane Spermien	Mumps	nein
Bande 17 humane Spermien	Prolaktin hoch	nein
Bande 17 humane Spermien	Prolaktin niedrig	nein
Bande 17 humane Spermien	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 17 humane Spermien	Varicocele	nein
Bande 17 humane Spermien	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Agglutination	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Bande 22 Hodenproteine der Maus	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Bande 22 humane Spermien	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Eosin niedrig	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Hodentorsion	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Immunfluoreszenz	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Immunobeadassay	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Inhibin niedrig	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Lageanomalie	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Leukozyten	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Makrophagen	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Morphologie	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Motilität niedrig	ja
Bande 22 humane Hodenproteine	Mumps	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Prolaktin hoch	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Prolaktin niedrig	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 22 humane Hodenproteine	Varicocele	nein

Merkmal A	Merkmal B	Korrelation
Bande 22 humane Hodenproteine	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 22 humane Spermien	Agglutination	nein
Bande 22 humane Spermien	Chlamydien IgA (ELISA)	ja
Bande 22 humane Spermien	Eosin niedrig	nein
Bande 22 humane Spermien	Hodentorsion	nein
Bande 22 humane Spermien	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 22 humane Spermien	Immunfluoreszenz	nein
Bande 22 humane Spermien	Immunobeadassay	nein
Bande 22 humane Spermien	Inhibin niedrig	ja
Bande 22 humane Spermien	Lageanomalie	nein
Bande 22 humane Spermien	Leukozyten	nein
Bande 22 humane Spermien	Makrophagen	nein
Bande 22 humane Spermien	Morphologie	ja
Bande 22 humane Spermien	Motilität niedrig	nein
Bande 22 humane Spermien	Mumps	nein
Bande 22 humane Spermien	Prolaktin hoch	nein
Bande 22 humane Spermien	Prolaktin niedrig	nein
Bande 22 humane Spermien	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 22 humane Spermien	Varicocele	nein
Bande 22 humane Spermien	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Agglutination	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Bande 26 Hodenproteine der Maus	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Bande 26 humane Spermien	ja
Bande 26 humane Hodenproteine	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Eosin niedrig	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Hodentorsion	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Immunfluoreszenz	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Immunobeadassay	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Inhibin niedrig	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Lageanomalie	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Leukozyten	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Makrophagen	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Morphologie	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Motilität niedrig	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Mumps	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Prolaktin hoch	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Prolaktin niedrig	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Varicocele	nein
Bande 26 humane Hodenproteine	Zahl der Spermien niedrig	nein
Bande 26 humane Spermien	Agglutination	nein
Bande 26 humane Spermien	Chlamydien IgA (ELISA)	nein
Bande 26 humane Spermien	Eosin niedrig	nein
Bande 26 humane Spermien	Hodentorsion	nein

Merkmal A	Merkmal B	Korrelation
Bande 26 humane Spermien	IL 6 (ELISA)	nein
Bande 26 humane Spermien	Immunfluoreszenz	nein
Bande 26 humane Spermien	Immunobeadassay	nein
Bande 26 humane Spermien	Inhibin niedrig	nein
Bande 26 humane Spermien	Lageanomalie	nein
Bande 26 humane Spermien	Leukozyten	nein
Bande 26 humane Spermien	Makrophagen	nein
Bande 26 humane Spermien	Morphologie	nein
Bande 26 humane Spermien	Motilität niedrig	nein
Bande 26 humane Spermien	Mumps	nein
Bande 26 humane Spermien	Prolaktin hoch	nein
Bande 26 humane Spermien	Prolaktin niedrig	nein
Bande 26 humane Spermien	Serumantikörper (ELISA)	nein
Bande 26 humane Spermien	Varicocele	nein
Bande 26 humane Spermien	Zahl der Spermien niedrig	nein

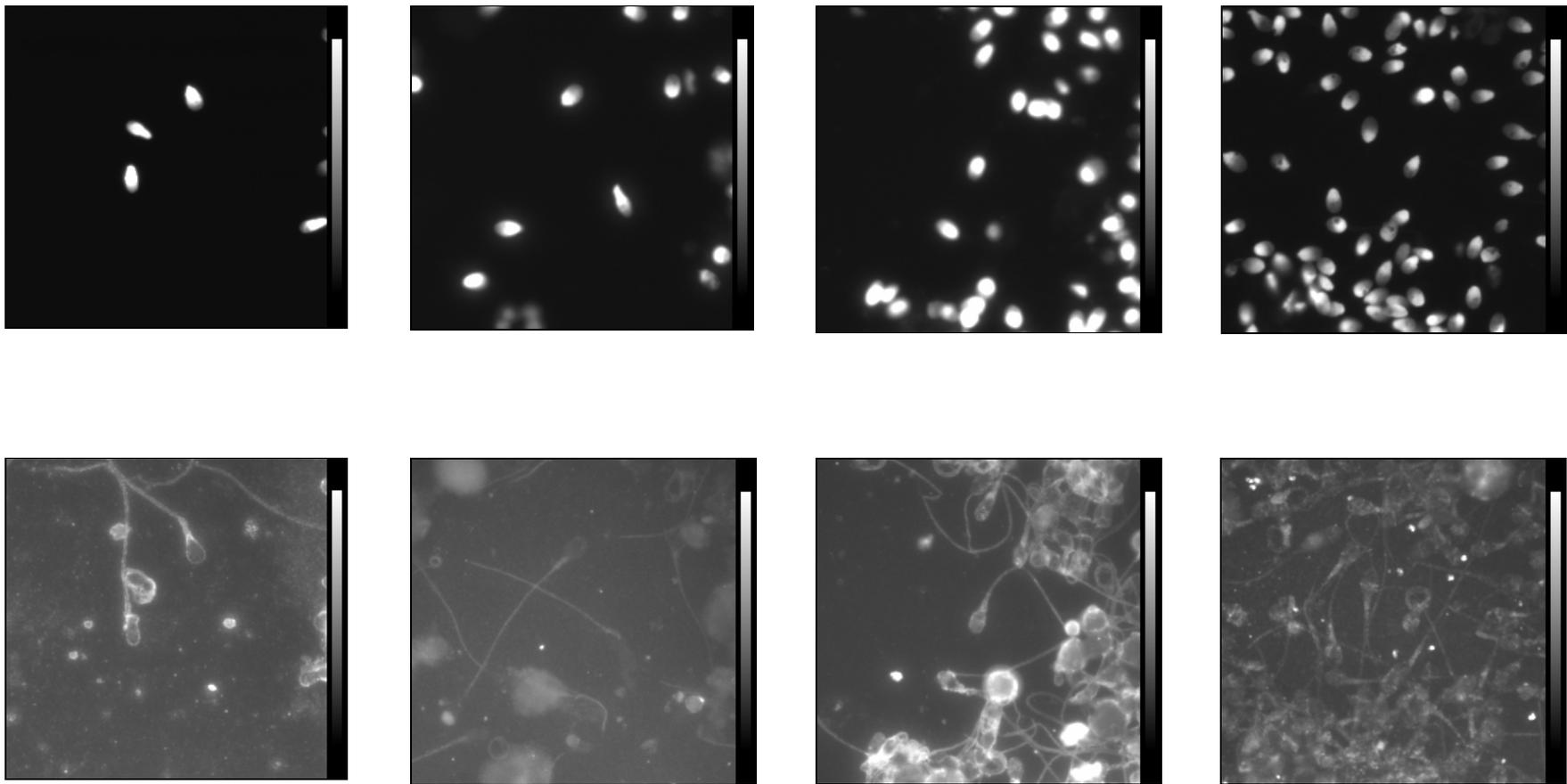


Abb. 3: Bildtafel Immunfluoreszenz

Beispiele für Immunfluoreszenzpräparate in der 1. und 2. Zeile, betrachtet unter dem Fluoreszenzmikroskop (1. Zeile) und unter dem Phasenkontrastmikroskop (2. Zeile).

In den Spalten 1 und 2 Präparate von Patient Nr. 26, in den Spalten 3 und 4 Präparate von Patient Nr. 34.

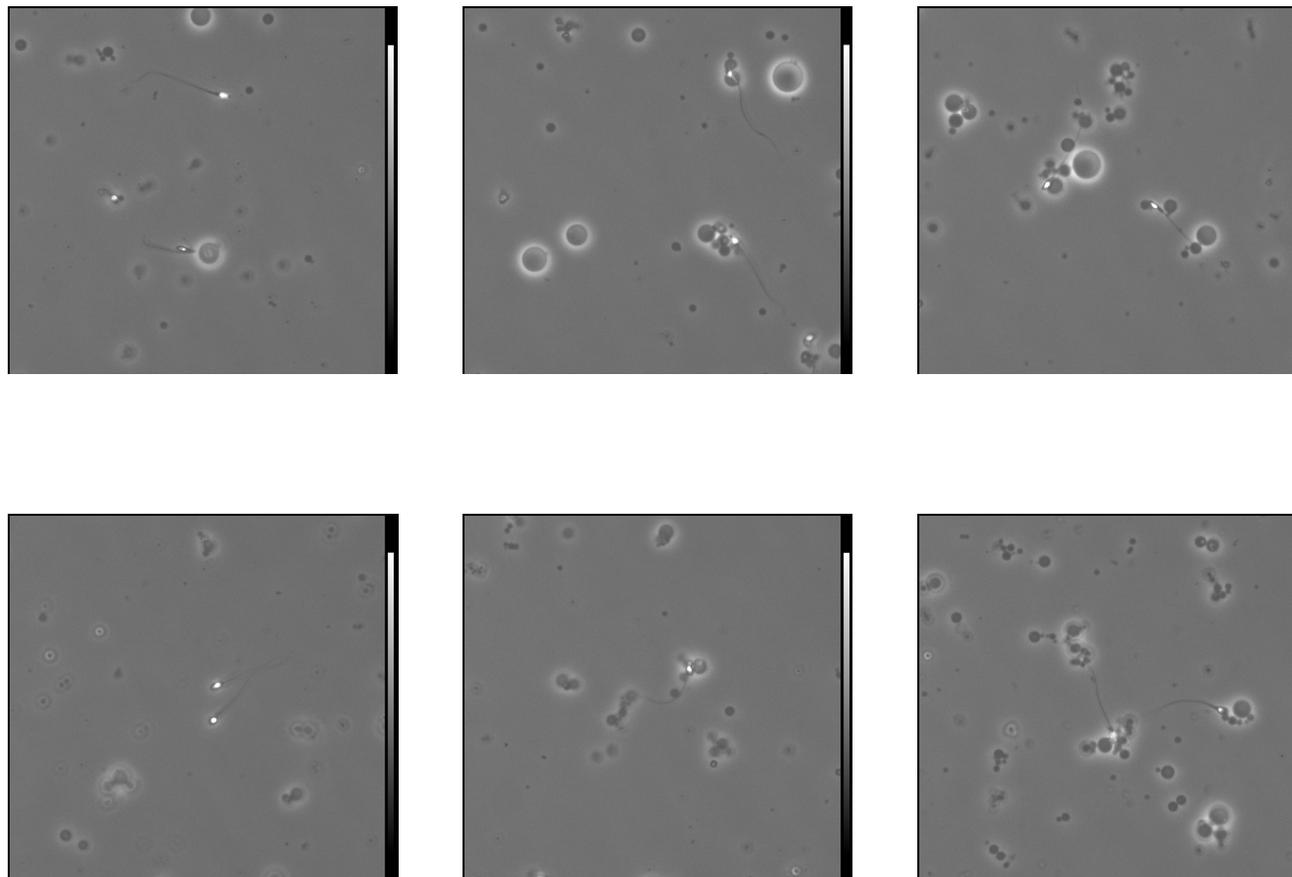


Abb. 4: Bildtafel Immunobeadassay

Beispiele für Negativreaktionen der Immunobeadassaypräparate (1. Spalte) und Positivreaktionen (2. Spalte: Patient und 3. Spalte), betrachtet unter dem Phasenkontrastmikroskop
In der Spalte 1 Präparate von Patient Nr. 1, in der Spalte 2 Präparate von Patient Nr. 11 und in der Spalte 3 Präparate von Patient Nr. 22.

10. Literaturverzeichnis

Abshagen K, Behre HM, Cooper TG, Nieschlag E. Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates. *Fertil Steril* 1998; 70: 355-356

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 28-49

Allison AC, Hartree EF. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J Reprod Fertil* 1970; 21: 501-515

Appelt H, Strauß B. Psychoendokrinologie der weiblichen Sexualität. *Der Gynäkologe* 1986; 19, 11-18

Austin CR. Membran fusion events in fertilization. *J Reprod Fertil* 1975; 44: 155

Barrat CLR, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and the female reproductive tract. *Hum Reprod* 1990; 5: 639-648

Berookhim B, Palermo G, Zaninovic N, Rosenwaks Z, Schlegel P. Microdissection testicular sperm extraction in men with Sertoli cell-only testicular histology. *Fertil Steril* 2014; 102: 1282-1286

Bohring C, Krause W. The characterization of human spermatozoa membrane proteins-surface antigens and immunological infertility. *Electrophoresis* 1999; 20: 971-976

Bohring C, Krause W. The intra- and inter-assay variation of the indirect mixed agglutination reaction test: is a quality control suitable? *Hum Reprod* 1999; 14: 1802-1805

Bohring C, Krause W. Difference in the antigen pattern recognized by antisperm antibodies in patients with infertility and vasectomy. *J Urol* 2001; 166: 1178-1180

Bonrath EM. Anti-Testikuläre-Antikörper im Serum eines unfruchtbaren Mannes: Isolierung und Charakterisierung eines testikulären Antigens. Diss, Medizinische Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2003 74

Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relations between sperm count and semen volume and pregnancies obtained during a twenty-year-follow-up period. *Int J Androl* 1982 a; 5: 267-275

Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relation between morphologically abnormal spermatozoa and pregnancies obtained a twenty-year-follow-up period. *Int J Androl* 1982 b; 5: 379-386

Brähler E, Stöbel-Richter Y, Huinink J, Glander HJ. Zur Epidemiologie gewollter und ungewollter Kinderlosigkeit in Ost-Westdeutschland. *Reproduktionsmedizin* 2001; 17: 157-162

Bronson RA, Cooper GW, Rosenfeld DL. Correlation between regional specificity of anti-sperm antibodies to the spermatozoon surface and complementmediated sperm immobilization. *Am J Reprod Immunol* 1982; 2: 222-224

Bronson RA, Cooper GW, Rosenfeld DL. Sperm antibodies: Their role in infertility. *Fertil Steril* 1984; 42: 171-183

Brukkert E. How frequent is unintentional childlessness in Germany? *Andrology* 1991; 23: 245-250

Caroppo E. Sperm sorting for selection of healthy sperm: is it safe and useful? *Fertil Steril* 2013; 100: 695–696

Cheng CY, Bardin CW. Rat testicular testibumin is a protein responsive to follicle stimulating hormone and testosterone that shares immunodeterminants with albumin. *Biochemistry* 1986; 25: 5276-5288

Cohen J, Edwards R, Fehilly C, Fishel S, Hewitt J, Purdy J, Rowland G, Steptoe P, Webster J. In vitro fertilization: a treatment for male infertility. *Fertil Steril* 1985; 43: 422-432

Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 47: 200-202

Day MJ. Detection of equine antisperm antibodies by indirect immunofluorescence and the tube-slide agglutination test. *Equine vet J* 1996; 28: 494-496

Dedy NJ. Anti-Testikuläre Antikörper bei einem Patienten mit Asthenozoospermie: Isolierung und Charakterisierung eines testikulären Antigens. *Diss Univ Bonn* 2003; 72

Deutsche Gesellschaft für Reproduktionsmedizin e. V. 50 Jahre DGRM. DGRM – Geschäftsstelle (Hrsg) Dortmund, 2008

Deutsches IVF-Register Jahrbuch 2009, D.I.R. Bundesgeschäftsstelle bei der Ärztekammer, Schleswig Holstein (Hrsg) Bad Segeberg, 2009

DPC Biermann GmbH: Firmenmitteilungen News & Views, Ausgabe Mai 2001

Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers-Theunissen RP. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod* 2006; 21: 1725-1733

Eggert-Kruse W, Christmann M, Gerhard I, Pohl S, Klinga K, Runnebaum B. Circulating antisperm antibodies and fertility prognosis: a prospective study. *Hum Reprod* 1989; 4: 513-520

Eggert-Kruse O, Bellmann A, Rohr G, Tilgen W, Runnebaum B. Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male infertility. *Fertil Steril* 1992; 58: 1046-1055

Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* 1971; 251: 427-434

Esterbauer B, Jungwirth A. Erectile dysfunction. *Wien Med Wochenschr.* 2009; 159: 529-534

Fijak M, Zeller T, Huys T, Klug J, Wahle E, Linder M, Haidl G, Allam J, Pilatz A, Weidner W, Schuppe H, Meinhardt A. Autoantibodies against protein disulfide isomerase ER-60 are a diagnostic marker for low-grade testicular inflammation. *Hum Reprod* 2014; 29: 2382-2392

Frapsauce C, Pionneau C, Bouley J, Delarouziere V, Berthaut I, Ravel C, Antoine J, Soubrier F, Mandelbaum J. Proteomic identification of target proteins in normal but non-fertilizing sperm. *Fertil Steril* 2014; 102: 372–380

Gelly JL, Richoux JP, Georges G. Immunolocalization of albumin and transferrin in germ cells and Sertoli cells during rat gonadal morphogenesis and postnatal development of the testis. *Cell Tissue Res* 1994; 276: 347-351

Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum Reprod* 2003; 18: 1959-1966

Gonzales GF, Kortebrani G, Mazzoli AB. Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil Steril* 1992; 57: 1058-1065

Haas GG, DeBault LE, Nahhas F, D’Cruz O, Shuey R. The effect of fixatives and/or air drying on the plasma membranes of human sperm. *Fertil Steril* 1988; 50: 487-492

Hagemann T, Haidl G. Veränderungen der männlichen Fertilität im Alter. *Reproduktionsmedizin* 2001; 17: 254-260

Hagemann T, Haidl G. Der Einfluss von Nikotin, Alkohol und Medikamenten/Drogen auf die männliche Fertilität. *Reproduktionsmedizin* 2002; 18: 3-6

Haidl G, Badura B, Schill WB. Function of human epididymal spermatozoa. *J Androl* 1994; 15: 23-27

Haidl G, Weidner W, Behre H, Beutel M, Brähler E, Hertle L, Krause W, Ludwig G, Nieschlag E, Voigt A, Wirth M, Schalkhäuser K, Popa G. Konsensuspapier „Der alternde Mann“. *Reproduktionsmedizin* 2000; 16: 439–440

Haidl G. Männliche Fertilitätsstörung - Untersuchung. In: Schirren C, Hrsg. Unerfüllter Kinderwunsch - Leitfaden Reproduktionsmedizin für die Praxis. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag 2003: 259–279

Haidl G. Die klinische Untersuchung in der Andrologie. *Blickpunkt Der Mann*. 2006; 4: 23–25

Haidl G, Allam JP, Schuppe HC. Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia* 2008; 40: 92-96

Hedger MP. Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev Reprod* 1997; 2: 38-47

Helmerhorst FM, Finken MJ, Erwich JJ. Antisperm antibodies: detection assays for anti-sperm antibodies: what do they test? *Hum. Reprod* 1999; 14: 1669-1671

Henkel R, Maass G, Jung A, Haidl G, Schill WB, Schuppe HC. Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl* 2007; 9: 299-304

Holland-Moritz H, Krause W. Semen analysis and fertility prognosis in andrological patients. *Int J Androl* 1992; 5: 473-484

ICD-10. DIMDI (Hrsg.). Bern: Verlag Hans Huber 2001

Jarvi K, Roberts KD, Langlais J, Gagnon C. Effect of platelet-activating factor, lyso-platelet-activating-factor and lysophosphatidylcholine on sperm motion: importance of albumin for motility stimulation. *Fertil Steril* 1993; 59: 1266-1275

Jones WR. Immunologic infertility - fact or fiction? *Fertil Steril* 1980; 33: 577-586

Fraczek M, Wiland E, Piasecka M, Boksa M, Gaczarzewicz D, Szumala-Kakol A, Kolanowski T, Beutin B, Kurpisz M. Fertilizing potential of ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection. *Fertil Steril* 2014; 102: 711–719

König OC. Nachweis und Isolierung eines Autoantikörpers gegen Proteindisulfid Isomerase bei einem infertilen Patienten. *Diss Univ Bonn* 2003; 52

Krapez JA, Hayden CJ, Rutherford AJ, Balen AH. Survey of the diagnosis and management of antisperm antibodies. *Hum Reprod* 1998; 13: 3363-3367

Krause W, Bohring C. Immunologische Infertilität. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; 99: 2417–2423

Krause W, Arbeitskreis Andrologie der Dermatologen. Immunologische Infertilität. *JDDG* 2005; 3: 650–655

Kremer J, Jager S. The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. *Hum Reprod* 1992; 7: 781-784

Kyhse-Andersen J. Electroblothing from multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins to nitrocellulose membrans. *J Biochem Biophys Methods* 1984; 10: 203-209

Ludwig M, Gromoll J, Hehr U, Wieacker P. Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsgenetik der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin: Empfehlung zur genetischen Diagnostik bei Kinderwunschpaaren. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2004; 1: 190-193

Maier SH, Gschwend JE, Hautmann RE, Löffler M, Sterzik K, Strehler E. Langzeitergebnisse der assistierten Fertilisation. *J Fert Reprod* 2000; 10: 17-23

Mann T. Metabolism of semen: Fructolysis, respiration and sperm energetics. In: John Wiley Hrsg. *The Biochemistry of semen and the male reproductive tract*. New York: Barnes & Noble, 1964: 265–307

Mazumdar S, Levine AS. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Fertil Steril* 1998; 70: 799-810

Meister U, Stöbel-Richter Y, Finck C, Brähler E. Einstellungen zur Reproduktionsmedizin und PID in der deutschen Allgemeinbevölkerung. In: Hallner D, von dem Knesebeck O, Hasenbring M, Hrsg. *Neue Impulse in der Medizinischen Psychologie und Medizinischen Soziologie. Abstractband zum gemeinsamen Kongress der DGMP und DGMS in Bochum*. Lengerich: Pabst Science Publishers, 2004: 11-12

Montag M, van der Ven H. Presence of antibodies to soluble sperm proteins and testicular proteins in serum of male patients with oligoasthenoteratozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 129

Montag M, Bopp A, van der Ven H, Haidl G. Presence of serum antibodies to testicular proteins in infertile males with a previous history of testicular biopsy. *Hum Reprod* 1998; 13: 74

Montag M, van der Ven H, Haidl G. Recovery of ejaculated spermatozoa for intra-cytoplasmic sperm injection after anti-inflammatory treatment of an azoospermic patient with genital tract infection: a case report. *Andrologia* 1999; 31: 179-181

Montag M, van der Ven H. Gibt es Indikationen für "assisted hatching"? Gynäkologe, 2000; 33, 772-776

Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. J Cell Biol 1967; 33: 307-318

Naz RK. Modalities for treatment of antisperm antibody mediated infertility: novel perspectives. Am J Reprod Immunol 2004; 51: 390-397

Naz RK. Search for peptide sequences involved in human antisperm antibody-mediated male immunoinfertility by using phage display technology. Mol Reprod Dev 2005; 72: 25-30

Ohtani H, Wakui H, Ishino T, Komatsuda A, Miura AB. An isoform of protein disulfide isomerase is expressed in the developing acrosome of spermatids during rat spermiogenesis and is transported into the nucleus of mature spermatids and epididymal spermatozoa. Histochem 1993; 100: 423-429

Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Vandeput H, Gielen J, Pollet H, Maes M, Steeno O, Kruger T. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. Hum Reprod 1997; 12: 987-993

Paasch U, Salzbrunn A, Glander HJ, Plambeck K, Salzbrunn H, Grunewald S, Stucke J, Vierula M, Skakkebaek NE, Jorgensen N. Semen quality in sub-fertile range for a significant proportion of young men from the general German population: a coordinated, controlled study of 791 men from Hamburg and Leipzig. Int J Androl 2008; 31: 93-102

Paradowska A, Bohring C, Krause E, Krause W. Identification of evolutionary conserved mouse sperm surface antigens by human antisperm antibodies (ASA) from infertile patients. Am J Reprod Immunol. 2006; 55: 321-330

Pöllänen P, Cooper TG. Immunology of the testicular excurrent ducts. *J Reprod Immunol* 1994; 26: 167-216

Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A crosssectional analysis. *Hum Reprod* 2007; 22: 188-196

Ribeiro S, Sartorius G, Geyter C. Sorting of spermatozoa with flow cytometry. *Fertil Steril* 2013; 100: 15

Richter-Kuhlmann E. Fortpflanzungsmedizin: Eine stille Revolution. *Deutsches Ärzteblatt* 2014; 13: 307

Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revised) *Immunol Today* 1993; 14: 426

Saacke RG, Marshall CE. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1968; 16: 511-514

Salvolini E, Buldreghini E, Lucarini G, Vignini A, Lenzi A, Primio R, Balercia G. Involvement of sperm plasma membrane and cytoskeletal proteins in human male infertility. *Fertil Steril* 2013; 99: 697-704

Schill WB. Behandlung von testikulären Fertilitätsstörungen des Mannes. In: Kaiser R, Schumacher GFB, Hrsg. *Menschliche Fortpflanzung. Fertilität - Sterilität - Kontrazeption*. Stuttgart-New York: Thieme, 1981: 240-251

Silverstein AM. Contrasting fluorescent labels for two antibodies. *J Histochem Cytochem* 1957; 5: 94-95

Sinton EB, Riemann DC, Ashton M. Antisperm Antibody Detection Using Concurrent Cytofluorometry and Indirect Immunofluorescence Microscopy. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 242-246

Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 1975; 98: 503-517

Steck T. *Praxis der Fortpflanzungsmedizin*. Stuttgart: Schattauer 2001

Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 366

Talbert LM, Hammond MG, Halme J, O`Rand M, Fryer JG, Ekstrom RD. Semen parameters and fertilization of human oocytes in-vitro: a multivariable analysis. *Fertil Steril* 1987; 48: 270-277

Töpfer-Petersen E, Schmoeckel C, Schill WB. The acrosomal membrane system of boar spermatozoa - morphological and biochemical studies. *Andrologie* 1983; 15: 62-70

Towbin H, Staehelin J, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354

Tung KSK, Teuscher C. Mechanisms of autoimmune disease in the testis and ovary. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 35-50

Valli H, Sukhwani M, Dovey S, Peters K, Donohue J, Castro C, Chu T, Marshall G, Orwig K. Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells. *Fertil Steril* 2014; 102: 566–580

Van der Ven K, Messer L, Van der Ven H, Jeyendran RS, Ober C. Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Hum Reprod* 1996; 11: 513-517

Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Physiologie der Hodenfunktion. In: Nieschlag E, Behre HM, Hrsg. *Andrologie*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 2000: 27-67

Wischmann T, Thorn P. Der Mann in der Kinderwunschbehandlung (unter besonderer Berücksichtigung der donogen Insemination). *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2014; 11: 134-141

Witkin SS. Mechanisms of active suppression of the immune response to spermatozoa. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 17: 61-64

Wolf JP, Roudrigues TL, De Almeida M, Jouannet P, Ducot B. High levels of sperm-associated antibodies impair human sperm-oolemma interaction after subzonal insemination. *Fertil Steril* 1995; 63: 584-590

Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 1990; 53: 528-536

Wolff H, Bezold G, Zebhauser M, Meurer M. Impact of clinically silent inflammation on male genital tract organs as reflected by biochemical markers in semen. *J Androl* 1991; 12: 331-334

World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 3rd ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1992: 107

World Health Organisation (WHO). Anhang. In: WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. Heidelberg: Springer, 1999: 73-129

Würfel W. Methoden der assistierten Reproduktion bei andrologischen Indikationen. Blickp Mann 2007; 5: 4-11

Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 1959; 184: 1648-1649

Yamamoto M, Hibi H, Miyake K. Effect of albumin on proluminal movement of ³H-Androgen into seminiferous and epididymal tubules and androgen binding in the interstitium of the testis and epididymis after perfusion with fluid containing albumin. Nagoya J Med Sci 1994; 57: 133-142

Young LG, Smithwick EB. Binding of Sperm-Reactive Antibodies in Human Sera to Surface-Associated Antigens on Human Sperm Compared by Indirect Immunobead, Immunofluorescence, and Immunogold-Assay. Am J Reprod Immunol 1991; 25: 41-47

Zalata A, El-Mogy M, Abdel-Khabir A, El-Bayoumy Y, El-Baz M, Mostafa T. Sperm caspase-9 in oligoasthenoteratozoospermic men with and without varicocele. Fertil Steril 2011; 96: 1097–1099

Zorn B, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H. Semen granulocyte elastase: its relevance for diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. Hum Reprod 2000; 15: 1978-1984

Danksagung

Meinem Doktorvater und Direktor der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin des Zentrums für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Professor Dr. med. Hans H. van der Ven, danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Dissertation anzufertigen.

Dank gebührt in hohem Maße meinem Betreuer und ehemaligem Laborleiter für IVF der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Professor Dr. rer. nat. Dipl. Biol. Markus Montag der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen der Universitäts-Frauenklinik Heidelberg, der mir bei der Planung, der Durchführung der Experimente, der Auswertung der Ergebnisse und der Fertigstellung dieser Arbeit mit Rat, Expertise und schier unendlicher Geduld stets zur Seite stand.

Ich danke besonders dem Leiter der Abteilung für Andrologie der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Bonn, Professor Dr. med. Gerhard Haidl dafür, dass er die Patientenseren von männlichen Sterilitätspatienten freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des andrologischen Labors der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin des Zentrums für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für ihre große Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Lars Eulberg für die Einführung in die Geheimnisse der Statistik.

Großer Dank an Ariane Cieslak des Medizinischen Dekanats der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für das formale Korrekturlesen.

Tief empfundene Dankbarkeit fühle ich für meinen geliebten Ehemann Michael, dessen Liebe und Unterstützung auf mannigfaltige Art mich allzeit begleitet hat.