

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

PAASCH U, GLANDER HJ, GRUNEWALD S

*Transduktion von Apoptosesignalen in ejakulierten Spermatozoen
nach Kryokonservierung via Aktivierung von Caspasen*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2003; 13 (2) (Ausgabe
für Schweiz), 20-27*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2003; 13 (2) (Ausgabe
für Österreich), 22-31*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

Transduktion von Apoptosesignalen in ejakulierten Spermatozoen nach Kryokonservierung via Aktivierung von Caspasen

U. Paasch, S. Grunewald, H. J. Glander

Einleitung: Es wurde untersucht, inwieweit Schädigungen der Spermienmembran mit zytosolischen Signalen der Apoptose, dem programmierten Zelltod, assoziiert sind. Diese Signale werden insbesondere durch Aktivierung von Caspasen vermittelt. Die Membran einer apoptotischen Zelle zeigt eine Externalisation von Phosphatidylserin (PS), das in intakten, nicht-apoptotischen Zellen nur auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert ist. Dieses Phänomen wurde genutzt, um ejakulierte Spermatozoen in Abhängigkeit von der Bindung von Annexin V-konjugierten MicroBeads (ANMB) und der superparamagnetischen Zellseparationstechnik (MACS) in zwei Zellpopulationen zu trennen: in eine ANMB-negative mit intakter Membran und in eine ANMB-positive. Annexin V kann die intakte Membran nicht passieren und deshalb PS in intakten Spermien nicht erreichen. Eine ANMB-Bindung ans Spermium charakterisiert entweder eine Externalisation von PS als frühes Ereignis der Apoptose oder eine allgemeine Beeinträchtigung der Membranintegrität. **Patienten und Methoden:** Zwanzig Ejakulate von 10 gesunden Probanden wurden gesplittet und eine Hälfte kryokonserviert. In den frischen und kryokonservierten Spermproben wurde vergleichend die Aktivierung der Caspasen (aCP) 8, 9, 1 und 3 in Abhängigkeit von der Annexin V-Bindung flowzytometrisch untersucht. **Ergebnisse:** Alle untersuchten Caspasen wurden erstmals im Spermienzytosol nachgewiesen. Außer Caspase 9, die eine mitochondriale Mittelstückfluoreszenz zeigte, wurden alle Caspasen postakrosomal lokalisiert. Die Kryokonservierung führte zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils von Spermatozoen mit aktivierten Caspasen (15,7 % in frischen vs. 40,8 % in kryokonservierten Spermien, $p < 0,01$). Die MACS-Technik separierte in Abhängigkeit von der ANMB-Bindung an das Spermien-PS eine ANMB-negative Spermienfraktion mit hochsignifikanter Verminderung ($p < 0,01$) von Spermien mit aktivierten Caspasen. Auch nach der Kryokonservierung war der Trenneffekt von MACS signifikant, jedoch unterschieden sich bezüglich der Caspase-Aktivierung die frischen ANMB-negativen Spermien nicht signifikant von den kryokonservierten ANMB-negativen Spermien ($p > 0,05$). Infolge der Kryokonservierung erhöhte sich allerdings signifikant ($p < 0,01$) die Chance eines Spermatozoons mit dem Verlust der Membranintegrität, auch Caspasen zu aktivieren. **Zusammenfassung:** Es wurde erstmals die Präsenz und koordinierte Kompetenz von zytosolischen Apoptosesignalen in Form aktivierter Caspasen in ejakulierten Spermatozoen aufgezeigt. Die Kryokonservierung führte zu einer signifikanten Aktivierung dieser Enzyme. Die Trennung der Spermatozoen in Abhängigkeit von ihrer Annexin V-Bindung führte zu einer signifikanten Verminderung von Spermien mit aktivierter apoptotischer Signalkaskade, sowohl in nativen als auch in kryokonservierten Spermproben mit erhöhter Membranschädigung. Aktive Caspasen waren aber auch zu einem Anteil zwischen 7% und 14% in frischen Spermatozoen mit intakter, nicht-apoptotischer Membran zu finden. Aufgrund des sehr weiten Substratspektrums der terminalen Caspase 3 in den Spermien ist eine Beeinflussung der fertilen Potenz des Spermatozoons nach Aktivierung sehr wahrscheinlich.

Objective: To study the relation between disintegration of plasma membrane and the activation of caspases, the transducers of apoptotic signals for programmed cell death in ejaculated spermatozoa. The spermatozoa were subpopulated by magnetic activated cell sorting (MACS) in dependence on sperm binding to superparamagnetic annexin V-conjugated microbeads (ANMB). The binding indicates an exposure of phosphatidylserine to the outer membrane (EPS) as an early event of apoptosis or a disturbance of membrane integrity. The resulting two populations were investigated for active caspases (aCP) 8, 9, 1 and 3, which mediate the main pathways of apoptosis. **Methods:** Twenty semen samples of 10 healthy volunteers were splitted to get two aliquots, which were examined before and after cryopreservation. The fresh or cryopreserved semen samples were further aliquoted into two by MACS getting ANMB-negative- and ANMB-positive-subpopulations in dependence on the sperm membrane integrity. Afterwards, the aCP 8, 9, 1 and 3 were detected in both subpopulations. **Results:** The aCPs were localized predominantly in the postacrosomal region except aCP9 which was found in the midpiece. The cryopreservation led to a significantly increased number of sperm showing an activation of all caspases investigated (15.7 % in native vs. 40.8 % in cryopreserved spermatozoa, $p < 0.01$). The MACS separation in dependence on binding of ANMB to PS resulted in a significant depletion ($p < 0.01$) of sperm with aCP within the ANMB-negative spermatozoa with intact membranes. The percentage of sperm with aCP within the ANMB-negative fraction was not significantly influenced by cryopreservation. The cryopreservation increased the probability that spermatozoa with aCP8, aCP9, aCP1 and aCP3 may also develop a disintegration of plasma membrane and appear in the ANMB-positive fraction. **Conclusions:** For the first time it is reported that initiator and effector caspases of the main pathways of apoptosis are present and ready to be coordinately activated in ejaculated spermatozoa. Activated caspases were found especially in spermatozoa with disturbed membranes, but spermatozoa with intact membranes do also house a small amount of aCP. The annexin V-MACS separation resulted in a significant depletion of spermatozoa having aCP within the ANMB-negative fraction. Hence a wide spectrum of cell cytoskeletal proteins and membrane components are targets of caspases, they very likely contribute to a decrease in the fertilization capacity. **J Fertil Reprod (Österreich) 2003; 13 (2): 22–31.**

Spermproben mit pathologischen Spermioogramm-Parametern weisen auf ein vermindertes Fertilisierungspotential hin und enthalten oft erhöhte Anteile von Spermien mit DNA-Strangbrüchen [1–5]. Spermatozoen mit fragmentierter DNA verursachen in der assistierten Reproduktionstechnik (ART) reduzierte Fertilisierungsraten nach in vitro-Fertilisation (IVF) und intrazytoplasmatischer Spermieninjektion in Oozyten (ICSI) [6, 7]. Die DNA-Fragmentation kann dabei das Resultat der Apoptose, des program-

mierten Zelltodes, sein. Ein Membransymptom der Apoptose ist die Externalisation von Phosphatidylserin (PS), das in intakten, nicht-apoptotischen Zellen nur auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert ist [8, 9]. Diese Veränderungen an der Membran waren auch an humanen Spermien nachweisbar und ermöglichten den Aufbau selektiver Nachweis- und Separationssysteme [10–13]. Das EPS hat eine sehr hohe Affinität zu Annexin V (AN), einem 35–36 kD phospholipidbindenden Protein [14]. Annexin V kann die intakte Membran nicht passieren und deshalb PS in intakten Spermien nicht erreichen. Eine Annexin V-Bindung ans Spermium charakterisiert entweder eine Externalisation von PS als frühes Ereignis der Apoptose oder eine allgemeine Beeinträchtigung der Membranintegrität. Obwohl der Zusammenhang zwischen Membranveränderung und programmiertem Zelltod (Apoptose) an somatischen Zellen gut aufgeklärt ist, sind die Details am Spermatozoon noch weitgehend unbekannt.

Abkürzungen: ANMB – Annexin V-MicroBeads; MACS – immunomagnetische Zellseparation (magnetic activated cell sorting); ANMB⁻ – Spermatozoen ohne gebundene Annexin V-MicroBeads; ANMB⁺ – Spermatozoen mit gebundenen Annexin V-MicroBeads; CP – Caspase

Von der Universitäts-Hautklinik Leipzig, Deutschland, Andrologie

Korrespondenzadresse: PD Dr. Uwe Paasch, Andrologie, Univ.-Hautklinik Leipzig, Stephanstraße 11, D-04103 Leipzig; E-mail: paau@server3.medizin.uni-leipzig.de

Der programmierte Abbau von Zellen (Apoptose) wird durch ein komplexes, reguliertes Signalnetzwerk vermit-

telt. Externe oder interne Signale führen über eine Aktivierung von Enzymen, insbesondere Caspasen (cytosolische Aspartat-spezifische Proteasen, CP) zur Exekution der Apoptose und zum Zelluntergang [15]. Die Apoptose kann im wesentlichen über „Todesrezeptoren“ (Typ I) oder intern über eine mitochondriale Aktivierung (Typ II) getriggert werden. Alle Signalwege werden durch unterschiedliche CP realisiert [15, 16]. Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden (Cysteiny-Aspartasen). Sie werden durch selektive Proteolyse und Dimerisation aus Zymogenen (Proenzyme) (Abb. 1) aktiviert. Die aktivierte Caspase (aCP) triggert eine zur Apoptose führende Signalkaskade, reguliert von zahlreichen assoziierten Elementen (Abb. 2). Am Ende der Signalkette werden durch die aktivierten Caspasen nahezu alle Zellbausteine abgebaut, wobei es zur spezifischen Fragmentation der DNA kommt [18–22]. In der Signalkette des Typ I-Weges der Apoptose, z. B. über den „Todesrezeptor“ CD95, der auch auf Spermien exprimiert wird, ist CP8 der wichtigste Mittler [23]. CP9 ist der wichtigste Signalvermittler für die mitochondriale Typ II-Apoptose, während CP3 eines der wichtigsten Enzyme für das terminale Apoptosestadium ist. Die CP3 wird durch die Initiator-Caspasen aktiviert und als aktives Enzym spaltet bzw. inaktiviert sie ca. 42 der 250 verschiedenen bis heute identifizierten Caspasen-Substratmoleküle. Insbesondere wird das zytoskelettale Protein Gelsolin abgebaut, das für die Organisation des Aktinfilament-Netzwerkes verantwortlich ist [24–28].

Das Auftreten von Spermatozoen mit DNA-Strangbrüchen im Ejakulat könnte sowohl durch Reifungsstörungen (defektes zytoplasmatisches und nukleäres Remodelling) während der Spermatogenese [29–31] als auch nach normaler Reifung durch Reaktivierung der apoptotischen Signalkaskade entstehen [2, 32, 33]. Die Caspase 3 wurde im humanen Hodengewebe gefunden [34], ihre Inaktivierung führte zu einer Blockade der Apoptose von Germinalzellen [4]. Ejakulierte Spermatozoen, die über Bindung von Annexin V-konjugierten MicroBeads (ANMB) an das Spermien-PS als Symptom von Apoptose und Membranschädigung immunmagnetisch angereichert wurden, wiesen ebenfalls aktivierte Caspasen auf [13]. Es ist bisher unklar, welche der Caspasen in Humanspermien vorkommen und ob die aktivierten CP in den Spermien das Resultat einer fehlgesteuerten, abortiven Apoptose während der Spermatogenese sind, oder ob externe Stimuli, z. B. Kryokonservierung, zu einer Reaktivierung führen können.

Wir untersuchten die Initiatoren für die Typ I- und Typ II-Apoptose, die Caspasen 8 und 9, die gemeinsam genutzte Effektorcaspase 3 und die CP1 wegen ihrer Rolle bei der p53-vermittelten Apoptose sowie die Entzündungsreaktionen [35, 36]. Es sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit eine Dysintegration der Spermienmembran mit Caspase-vermittelten Apoptosesignalen assoziiert ist und welchen Einfluß die Kryospermakonservierung auf diese Signalübertragungsmechanismen hat.

Patienten und Methoden

Auswahlkriterien für Samenproben

Zwanzig Ejakulate wurden von zehn gesunden Probanden nach dreitägiger sexueller Karenz gewonnen. Die Bestimmung der klassischen Spermioogrammvariablen folgte den WHO-Richtlinien [37].

Probenaufbereitung

Alle Proben wurden nach einer Glaswollfiltration mit dem Äquivalent humaner Tubenflüssigkeit (HTF) 1:1 verdünnt [38] und zweigeteilt, wonach der eine Teil nativ und der andere nach einer Kryokonservierung verwendet wurde. Aus beiden Teilen wurde durch einen zweimaligen Waschprozeß mit HTF (400 x g, 5 min) eine Spermien suspension mit definierter Spermienkonzentration hergestellt.

Kryokonservierung

Die Proben wurden mit TEST yolk buffer (TYB, (TES (N-tris[hydroxymethyl] methyl-2-aminoethanesulfonsäure) und Tris)) mit 12 % (v/v) Glycerolzusatz (Santa Ana, Californien, USA, Irvine Sci.) als Kryoprotektivum tropfenweise verdünnt [10], in Cryo Tubes zu 1,8 ml der Firma Inter Med® abgefüllt [39] und anschließend mit dem System NICOOL LM 10 der Firma Compagnie Francaise de Produits Oxygenes stufenweise (15 min Stufe 2 und 15 min Stufe 10) abgekühlt [40, 41].

Immunmagnetische Spermienseparation (MACS) mit magnetischen Annexin V-MicroBeads (ANMB)

Das MACS-System bestand aus superparamagnetischen MicroBeads, Trennsäulen und einem Magneten. MicroBeads sind Partikel aus Eisen-II-Oxid, die in einem Dextrangerüst eingebettet waren und zur Verhinderung von Sedimentation und Aggregation in einer stabilen, kolloidalen Lösung vorlagen. Aufgrund ihrer extrem geringen Größe (~50 nm) war eine mechanische Belastung der Zellen und eine Störung bei der Flowzytometrie ausgeschlossen. Für die Experimente wurden Annexin V-MicroBeads (ANMB, Death Cell Removal Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Die Trennsäulen bestanden aus hydrophob und hydrophil beschichteten, miteinander verklebten Eisenkugeln. Der Magnet des Systems war gesintertes Barium-Neodym mit einem Magnetfeld von 1,5 Tesla in der Säulenmitte, das etwa den in Magnetresonanztomographen verwendeten Stärken entsprach. Nach Inkubation der Spermien suspension mit Bindungspuffer und 100 µl Annexin-MicroBeads wurde die im Magneten befestigte Trennsäule mit der Spermien suspension beladen, ohne Druck gespült und die Fraktion der ANMB-negativen Spermien aufgefangen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die darin verbliebenen ANMB-positiven Spermien durch einmaliges Spülen unter Druck eluiert.

Messung aktiver Caspasen

Der Nachweis aktivierter Caspasen erfolgte mit einem für die jeweilige Caspase spezifischen Substrat (Tabelle 1), das an ein nicht-fluoreszierendes Fluorogen und an einen

Tabelle 1: Selektiver Nachweis aktivierter Caspasen mit fluorogenmarkierten, spezifisch inhibierenden Caspase-Substraten

Caspase	Inhibitor: Carboxyfluoresceinderivat (FAM) - Fluoromethylketon (FMK)	
Caspase-1	FAM-YVAD-FMK	Benzoyloxycarbonyl-Tyrosylvalylalanylaspargat-FMK
Caspase-8	FAM-LETD-FMK	Benzoyloxycarbonyl-Leucylglutamylthreonylaspargat-FMK
Caspase-9	FAM-LEHD-FMK	Benzoyloxycarbonyl-Leucylglutamylhistidylaspargat-FMK
Caspase-3	FAM-DEVD-FMK	Benzoyloxycarbonyl-Valylglutamylisoleucylaspargat-FMK

Enzyminhibitor gekoppelt war. Der Komplex war zell-permeabel und nicht zytotoxisch (CaspasTag™ Caspase Activity Kits, Intergen S7303, S7301, S7304 und S7305, Oxford, UK). Nach Spaltung des Fluorogens Carboxyfluorescein entstand ein fluoreszierendes Präzipitat in der Zelle. Gleichzeitig blockierte der Enzyminhibitor Fluoromethylketon die CP über eine kovalente Bindung am Reaktionszentrum [42, 43]. Das gewaschene Spermienpellet wurde

in 100 µl des im Kit enthaltenen Waschpuffers resuspendiert und mit 10 µl der Testlösung 1 h bei 37° C im Wasserbad lichtgeschützt inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Spermien (5 min, 400 g in 2 ml HEPES-Puffer) erfolgte ihre flowzytometrische Analyse. Die ermittelten Fluoreszenzsignale als Folge der spezifischen Bindung und Spaltung der Komplexe waren dabei Ausdruck der Caspasenaktivität.

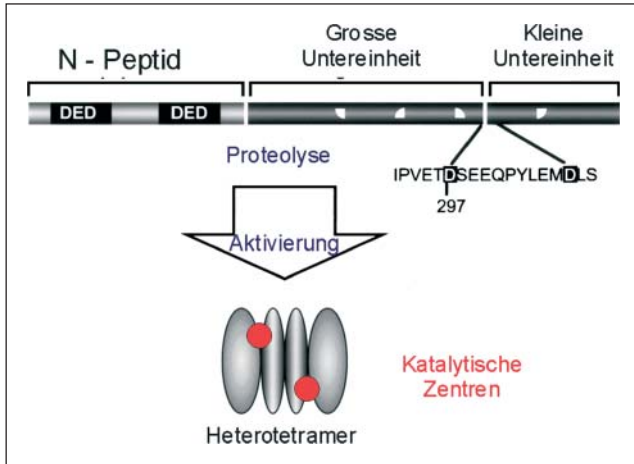


Abbildung 1: Aktivierung der Caspasen durch Abtrennung der Prodomäne und Assoziation zweier dimerer Untereinheiten zur aktiven Heterotetramerstruktur, modifiziert nach [17].

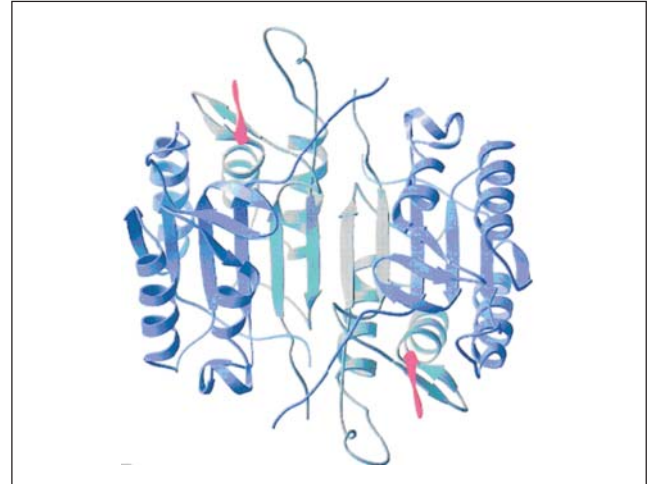


Abbildung 2: Die Heterotetramerstruktur aktivierter Caspasen, die roten Pfeile markieren die katalytischen Zentren, modifiziert nach [20].

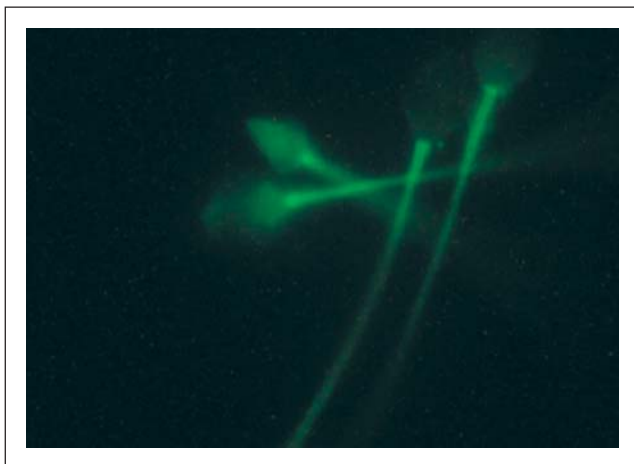


Abbildung 3a

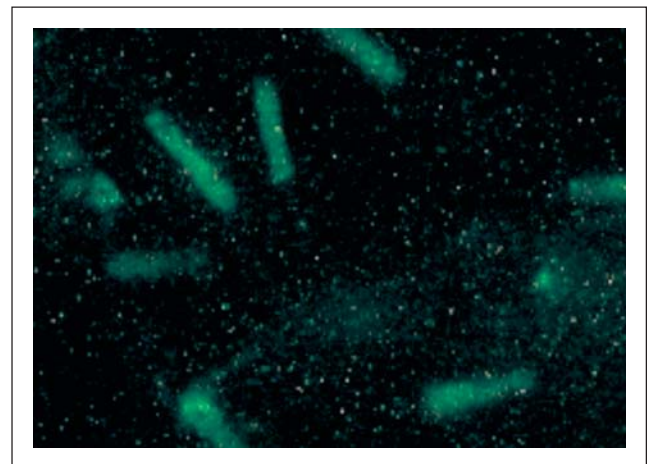


Abbildung 3b

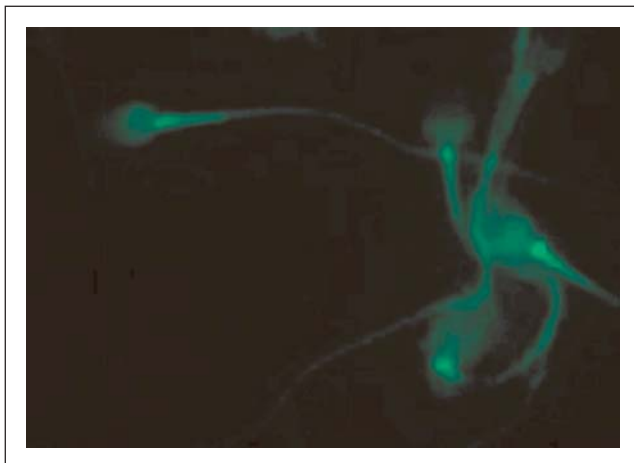


Abbildung 3c

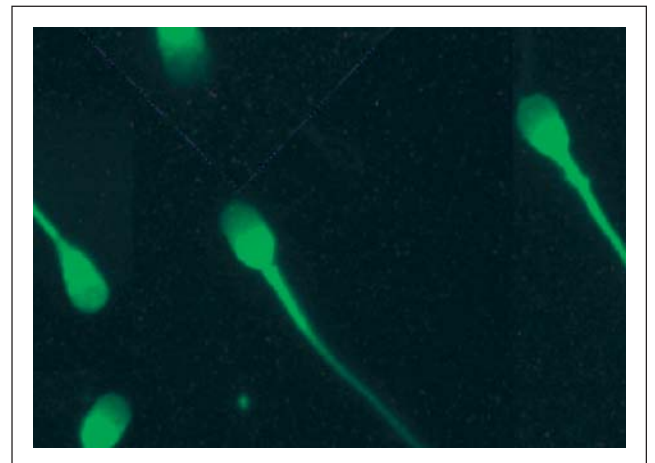


Abbildung 3d

Abbildung 3a–d: Fluoreszenzoptischer Nachweis aktivierter Caspasen 8, 9, 1 und 3 in ejakulierten Spermatozoen.

FACS-Analyse

Die durch MACS in ANMB-positive- und -negative Spermien getrennten Proben wurden mit dem Flowzytometer Coulter® Epics® XL™ (Coulter) analysiert. Der Anteil fluoreszierender Spermien wurde in einer Zellpopulation von mindestens 10.000 Zellen mit einem 15 mW Argonlaser bei 488 nm bestimmt. Als Negativkontrolle dienten gewaschene Spermien derselben unbehandelten Spermaprobe. Die Auswertung der Histogramme erfolgte mit der Software Expo32ADC (Coulter).

Computer-aided sperm motion analysis (CASA)

Die Spermatozoenmotilität wurde mit dem System „Mika Cell Motion Analyzer“ (Version 2.0, Microsoft® Windows® NT4.0, Mika Medical GmbH, Montreux, Schweiz) maschinell gemessen. In 5 µl Proben wurden jeweils mindestens 100 Spermatozoen aus mindestens 4 verschiedenen Feldern in der 10 µm tiefen Zählkammer von Strömberg-Mika analysiert. Es wurden von den ermittelten Parametern die Geschwindigkeiten über die tatsächlich zurückgelegte Bahn (VCL = Velocity Curvilinear), die Geschwindigkeit über eine gemittelte Bahn (VAP = Velocity Average Path) und die Geschwindigkeit über die direkte Verbindungslinie vom ersten bis zum letzten Meßpunkt (VSL = Velocity Straight Line) berücksichtigt. Die Spermien wurden anhand der VAP in immotile (VAP ≤ 5 µm/s), lokal motile (VAP ≤ 15 µm/s) und motile (VAP > 15 µm/s) Spermien klassifiziert.

Statistik

Die Daten wurden mit der Software Statistica 6.0 für Windows (StatSoft, Inc. Tulsa, OK 74104, USA) statistisch analysiert und als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) angegeben. Die Signifikanzprüfung von Unterschieden erfolgte entsprechend dem Datentyp und Verteilungsmuster mit dem t-Test, Wilcoxon- und Mann Whitney U-Test. $P < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Der Standardfehler (standard error, SE) ist in Box-Plots dargestellt.

Ergebnisse

Aktivierung der Caspasen 8, 9, 1 und 3

Jede der untersuchten Caspasen war aktiviert sowohl in nativen als auch in kryokonservierten Spermien fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar, aCP 8, 1 und 3 überwiegend mit postakrosomaler und aCP9 mit Mittelstück-Lokalisation (Abb. 3a–d). Der Nachweis von aCP9 im mitochondrialen Bereich ist gut mit einer Involvierung der aCP9 bei der mitochondrialen Typ II-Apoptose vereinbar. Die Kryokonservierung führte zu einer signifikanten Zunahme des Prozentsatzes von Spermien mit Aktivierung aller Caspasen (15,7% in nativen vs. 40,8% in kryokonservierten Spermien, $p < 0,01$) (Tab. 2). Parallel hierzu erhöhte sich der Anteil von Spermien mit gebundenen Annexin V-MicroBeads (ANMB) von 12,1% auf 40,6%. Die

Aktivierungsgrade der einzelnen CPs ließen zwar eine Reihung erkennen (aCP3 > aCP8 > aCP9 > aCP1), die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Kryokonservierung veränderte diese Reihenfolge nicht, allerdings führte eine geringere Aktivierung von CP1 zu signifikanten Unterschieden von aCP1 zu aCP3 und aCP8 ($p < 0,001$). Die höchste Aktivierung zeigte die CP3 mit 32,6% aCP3-positiven Spermien gefolgt von 30,5% aCP8-positiven, 22,2% aCP9-positiven und 15,5% aCP1-positiven Spermien (Tab. 2).

Aktivierung der Caspasen 8, 9, 1 und 3 in ANMB-negativen und ANMB-positiven Spermien-Fractionen nach Annexin V-MACS

Die immunmagnetische Trennung in Abhängigkeit von der Bindungsfähigkeit von Annexin V-konjugierten MicroBeads (ANMB) führte zu Subpopulationen mit signifikant unterschiedlichen Caspase-Aktivierungsgraden (Abb. 4). Im Vergleich zur unseparierten Probe war der Prozentsatz von nativen Spermien mit aCP8, aCP9, aCP1 und aCP3 in der ANMB-negativen Fraktion deutlich reduziert ($p < 0,01$) aber in der ANMB-positiven Fraktion angereichert ($p < 0,01$). Der Trenneffekt war in den nativen Spermien für die aCP8 und aCP9 höher als für die aCP1 und aCP3, der Unterschied war jedoch immer signifikant ($p < 0,01$) (Tab. 2). In den kryokonservierten Proben wurden dagegen alle Spermien mit aktivierten Caspasen ohne signifikante Unterschiede untereinander ($p > 0,05$) durch MACS auf fast ein Viertel reduziert ($p < 0,01$) (Tab. 2). In der ANMB-negativen Fraktion der nativen und kryokonservierten Spermien dominierte der Anteil von aCP3-positiven Spermien (aCP3 vs. aCP8 und aCP9; $p < 0,05$) und in der ANMB-positiven Fraktion der Spermienanteil mit aCP9 (aCP9 vs. aCP1 und aCP3; $p < 0,01$). Die CP1 war in allen Spermienpopulationen immer am geringsten aktiviert (aCP1 vs. aCP3, 8, 9; $p < 0,01$) (Tab. 3). Der Prozentanteil der Spermien mit aCP8, aCP9, aCP1 und aCP3 änderte sich in der ANMB-negativen Fraktion durch die Kryokonservierung nicht signifikant ($p > 0,05$). Im Gegensatz dazu erhöhte sich in der ANMB-positiven Fraktion der Anteil von Spermien mit aCP8, 9, 1 und 3 nach Kryokonservierung signifikant gegenüber den Nativspermien ($p < 0,01$) (Tab. 2). Dies spricht für einen Zusammenhang zwischen Membranschädigung und Aktivierung von CP.

Relation der intrazellulären Aktivierung von Caspasen zum Verlust der Membranasymmetrie

Bisher konnte nicht beantwortet werden, inwiefern die Aktivierung von CP im Rahmen der Kryokonservierung durch Membranschäden erfolgt oder ob es sich um einen unabhängigen Mechanismus handelt. Im folgenden wurde daher untersucht, mit welcher Wahrscheinlichkeit Spermien mit aCP auch membrangeschädigt, d. h. ANMB-positiv, sind. Der statistische Zusammenhang zwischen der Akti-

Tabelle 2: Prozentsatz von Spermatozoen mit aktivierten Caspasen (aCP) vor und nach Annexin V-MACS-Separation in den ANMB-negativen und ANMB-positiven Spermien, Mittelwert ± Standardabweichung, MACS: immunmagnetische Zellseparation, ANMB: superparamagnetische Annexin V-konjugierte Microbeads

Aktivierte Caspase	Spermien	ANMB-positive Spermien vor MACS [%]	Spermien mit aCP vor MACS [%]	Spermien mit aCP in der ANMB-negativen Fraktion [%]	Spermien mit aCP in der ANMB-positiven Fraktion [%]
aCP8	nativ	10,7 ± 4,3	16,0 ± 3,8	10,3 ± 2,2	65,3 ± 6,9
	kryokonserviert	49,2 ± 11,6	46,5 ± 9,6	9,5 ± 2,9	83,5 ± 5,4
aCP9	nativ	12,3 ± 10,2	14,9 ± 6,5	7,4 ± 3,3	68,3 ± 5,6
	kryokonserviert	32,3 ± 19,2	36,9 ± 16,8	10,8 ± 5,9	92,4 ± 2,0
aCP1	nativ	12,2 ± 5,1	13,8 ± 6,3	9,3 ± 6,1	48,1 ± 5,8
	kryokonserviert	31,5 ± 2,5	29,3 ± 5,8	8,9 ± 5,3	73,6 ± 7,8
aCP3	nativ	13,1 ± 5,1	18,1 ± 7,5	13,2 ± 6,7	50,8 ± 9,9
	kryokonserviert	49,7 ± 11,5	50,7 ± 5,9	14,3 ± 6,2	86,7 ± 4,3

vierung der einzelnen Caspasen und der Externalisierung von Phosphatidylserin wurde anhand der zur Basis 2 logarithmierten (\log_2) Odds Ratio (LOR) bewertet: $LOR = (\ln[OR = (\text{richtig Positive} \times \text{richtig Negative}) / (\text{falsch Positive} \times \text{falsch Negative})]) / \ln(2)$. Das Logarithmieren transformiert das in der Stichprobe beobachtete OR in eine annähernd normalverteilte Zufallsgröße. Der anstelle eines natürlichen Logarithmus (\ln) benutzte \log_2 erleichtert die Interpretation: eine Zunahme des \log_2OR um 1 bedeutet eine Verdopplung des OR (statt des Faktors 2,72 bei der Berechnung mit dem natürlichen Logarithmus). Im folgenden gibt das OR den Faktor an, um den die Chance von Spermien mit aCP im Vergleich zu Spermien ohne Caspase-Aktivierung größer ist, ANMB-positiv zu sein. Differenzen zwischen den \log_2OR in nativen und kryokonservierten Spermatozoen wurden mit dem t-Test für gepaarte Stichproben untersucht. Der Zusammenhang zwischen Aktivierung eines CP-Subtyps und einer Bindung von Annexin V an der geschädigten Membran war sowohl in nativen als auch in kryokonservierten Proben für die aCP9 am stärksten und für die aCP3 am geringsten ausgeprägt ($p < 0,01$). Im Rahmen der Kryokonservierung erhöht sich die Chance für Spermien mit aktivierten Caspasen 8, 9, 1 und 3 signifikant, ANMB-positiv zu sein, verglichen mit Spermien ohne aktivierte CP (Tab. 4, Abb. 5).

Der positive Vorhersagewert wurde zusätzlich ermittelt: *positive Prädiktion = richtig Positive x (richtig Positive + falsch Positive)*. Es unterschieden sich die Rangfolgen für die nativen Spermatozoen kaum ($aCP9 > aCP1 > aCP8 > aCP3$; $p > 0,05$) (Tab. 5). Nach der Kryokonservierung wurde eine andere Rangfolge als die für die LOR ermittelt: $aCP8 > aCP3 > aCP1 > aCP9$ ($p > 0,05$).

Korrelation des Ausmaßes aktivierter Caspasen 8, 9, 1 und 3 zur Spermien-Motilität

Unabhängig von den Caspase-Inhibitoren waren die Prozentanteile progressiv motiler Spermatozoen und ihre Abolutgeschwindigkeiten in den Proben nach der Kryokonservierung signifikant reduziert ($p < 0,01$). Die beiden durch MACS separierten ANMB-negativen und ANMB-positiven Spermien-Subpopulationen zeigten ebenfalls nach Kryokonservierung signifikant reduzierte Motilitätsparameter ($p < 0,01$) (Tab. 6). Die weitere Abnahme der Motilität in der ANMB-negativen Fraktion nach Inkubation mit dem Caspase-Inhibitor ist auf das Zentrifugieren zurückzuführen, das bei der Caspasen-Bestimmung erforderlich

ist. Es ließ sich weder in nativen noch in kryokonservierten Spermien eine signifikante Korrelation zwischen dem Prozentanteil von Spermien mit aktiver Caspase 8, 9, 1 und 3 und den Motilitätsparametern errechnen.

Diskussion

In Subpopulationen von ejakulierten Spermien mit unterschiedlicher Membranintegrität wurden erstmals aktive

Tabelle 3: Prozentanteile der Spermien mit aktivierten Caspasen 8, 9, 1 und 3 in den Spermien-Subpopulationen nach Annexin V-MACS; Wilcoxon-Test für nichtparametrische, abhängige Stichproben; Angabe der signifikanten p-Werte.

	ANMB-negativ		ANMB-positiv	
	nativ	kryokonserviert	nativ	kryokonserviert
CP8 vs. CP9				0,005
CP8 vs. CP1			0,005	0,022
CP8 vs. CP3		0,028	0,005	
CP9 vs. CP1			0,005	0,005
CP9 vs. CP3	0,037		0,007	0,013
CP1 vs. CP3				0,005

Tabelle 4: Das \log_2 Odd ratio (OR, Mittelwert \pm SD) der aCP 8, 9, 1 und 3 zeigt den Faktor an, um den die Chance von Spermien mit aCP im Vergleich zu Spermien ohne aCP größer ist, ANMB-positiv zu sein. Die Zunahme des \log_2OR um 1 bedeutet eine Verdopplung des OR. Differenzen zwischen den \log_2OR in nativen und kryokonservierten Spermatozoen wurden mit dem t-Test für gepaarte Stichproben untersucht.

Caspasen	\log_2OR , native Spermien	\log_2OR , kryokons. Spermien	$\Delta \log_2OR$	p
aCP8	4,1 \pm 0,6	5,7 \pm 0,7	1,6	0,001
aCP9	4,9 \pm 0,7	7,0 \pm 1,4	2,1	0,002
aCP1	3,6 \pm 1,5	5,2 \pm 1,1	1,7	0,037
aCP3	2,9 \pm 0,5	5,5 \pm 0,8	2,6	0,001

Tabelle 5: Prädiktion (Mittelwert \pm SD) von Spermien mit aCP 8, 9, 1 und 3 auch ANMB-positiv zu sein; Prüfung der Differenzen mit t-Test für gepaarte Proben.

Caspasen	Positive Prädiktion native Spermien	Positive Prädiktion kryokonservierte Spermien	Δ Positive Prädiktion	p
aCP8	41,7 \pm 9,2	88,1 \pm 8,3	44,6	0,001
aCP9	51,9 \pm 21,2	78,4 \pm 13,6	26,5	0,001
aCP1	44,2 \pm 19,4	80,5 \pm 9,5	36,5	0,001
aCP3	37,1 \pm 13,3	84,0 \pm 10,4	46,9	0,001

Tabelle 6: Motilitätsparameter progressiv motiler Spermatozoen (CASA) in der unseparierten und in den mittels Annexin V MACS generierten Subpopulationen nativer und kryokonservierter Spermatozoen (MW \pm SD)

Progressiv motile Spermien	nativ			kryokonserviert				
	%	VSL [μ m/s]	VAP [μ m/s]	VCL [μ m/s]	%	VSL [μ m/s]	VAP [μ m/s]	VCL [μ m/s]
Caspase 8								
Unsepariert	58,2 \pm 9,4	19,0 \pm 2,8	31,7 \pm 4,4	46,5 \pm 7,8	15,6 \pm 8,6	17,6 \pm 4,3	26,4 \pm 3,6	43,3 \pm 7,1
ANMB-negativ	27,5 \pm 14,6	11,0 \pm 2,0	24,2 \pm 3,0	41,8 \pm 5,9	5,8 \pm 5,8	14,5 \pm 5,8	22,6 \pm 5,2	62,1 \pm 29,3
ANMB-positiv	0,4 \pm 0,7	1,0 \pm 2,9	2,6 \pm 5,5	9,4 \pm 20,4	0,0	0,0	0,0	0,0
Caspase 9								
Unsepariert	54,0 \pm 14,9	27,1 \pm 7,0	42,9 \pm 8,6	65,4 \pm 17,8	10,1 \pm 5,0	28,0 \pm 10,0	34,0 \pm 9,1	50,2 \pm 12,7
ANMB-negativ	14,0 \pm 5,5	14,5 \pm 4,2	24,4 \pm 4,3	51,8 \pm 12,5	2,4 \pm 1,7	14,8 \pm 13,2	18,6 \pm 13,7	41,6 \pm 32,4
ANMB-positiv	0,3 \pm 0,6	1,1 \pm 3,1	3,6 \pm 7,9	11,9 \pm 25,4	0,0	0,0	0,0	0,0
Caspase 1								
Unsepariert	61,3 \pm 14,1	33,1 \pm 6,3	43,1 \pm 5,4	64,3 \pm 9,1	17,8 \pm 13,6	24,1 \pm 6,2	31,1 \pm 6,1	50,1 \pm 8,7
ANMB-negativ	25,0 \pm 13,4	16,2 \pm 4,9	25,3 \pm 7,3	44,2 \pm 16,0	7,2 \pm 3,5	11,3 \pm 6,7	18,7 \pm 8,2	48,0 \pm 26,9
ANMB-positiv	0,5 \pm 1,1	3,4 \pm 8,0	5,0 \pm 10,5	9,3 \pm 19,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Caspase 3								
Unsepariert	63,8 \pm 15,0	32,2 \pm 5,4	43,2 \pm 6,0	66,9 \pm 11,1	16,1 \pm 6,3	25,1 \pm 6,5	32,3 \pm 5,6	57,6 \pm 6,9
ANMB-negativ	29,5 \pm 22,1	18,5 \pm 4,1	26,7 \pm 5,0	44,0 \pm 9,6	6,0 \pm 6,4	15,2 \pm 8,0	21,4 \pm 10,8	65,0 \pm 63,8
ANMB-positiv	0,5 \pm 0,8	2,8 \pm 4,8	6,8 \pm 11,3	14,2 \pm 23,4	0,0	0,0	0,0	0,0

Caspasen (CP) beschrieben. Diese CP initiieren in Kombination mit der gemeinsam genutzten Effektor-Caspase 3 sowohl die Typ I- (CP8) als auch die Typ II- (CP9) Apoptose [44]. Die Kryokonservierung führte zu einer signifikanten Aktivierung dieser Enzyme. Die Trennung der Spermien in Abhängigkeit von ihrer Membranintegrität führte zu einer signifikanten Depletion von Spermien mit aktivierter apoptotischer Signalkaskade, sowohl in nativen als auch in kryokonservierten Spermien suspensionen. Aufgrund des sehr weiten Substratspektrums der terminalen Caspase 3 in den Spermien ist eine Beeinflussung der fertilen Potenz des Spermatozoons nach Aktivierung zu vermuten. Die CP1 mit Funktionen bei Entzündungsreaktionen und der p53-vermittelten Apoptose war von allen untersuchten CP am wenigsten aktiv. Die Immuntopographie zeigte einen engen Bezug zur Funktion der Caspasen. CP9 als Initiator der mitochondrialen Typ II-Apoptose war mitochondrial lokalisiert und alle anderen CP postakrosomal.

Mit dem Nachweis dieser aktiven Enzyme der Apoptose-Signalwege in Subpopulationen von ejakulierten Spermatozoen ergibt sich die Frage nach deren funktioneller Bedeutung. Die Apoptose ist ein energieabhängiger aktiver Prozeß, der auf bestimmte Signale hin ausgelöst wird. Relativ einfach lassen sich membran-assoziierte Apoptose-Signale erfassen. Deshalb wurden membranintakte Spermien von Spermien mit externalisiertem Phosphatidylserin oder beeinträchtigter Membranintegrität mittels immunmagnetischer Annexin V-Zellseparation getrennt [13]. In Abhängigkeit von der Bindung des Annexin V wurde sowohl in frischen als auch in kryokonservierten Proben eine signifikante Trennung der Spermien in Fraktionen mit geringer und hoher Caspase-Aktivität erreicht. In der ANMB-negativen Fraktion befanden sich die Spermien mit geringer Caspase-Aktivierung, während in der ANMB-positiven Fraktion Spermien mit aktivierten Caspasen angereichert wurden ($p < 0,01$). Insgesamt korrelierte die Annexin V-Bindung der Spermien signifikant positiv mit dem Aktivierungsgrad der Caspasen.

Die Kryokonservierung führte analog zu den Untersuchungsergebnissen mit einem Pan-Caspase-Inhibitor [12] zu einer Zunahme des Prozentanteiles von Spermien mit aCP8, aCP9, aCP1 und aCP3. Die ANMB-negative Fraktion wies jedoch im Gegensatz zur ANMB-positiven Fraktion immer hochsignifikant geringere Spermienzahlen mit aktivierten Caspasen auf. Die Integrität der Spermatozoenmembran erwies sich damit als Voraussetzung für eine inaktive Signalkaskade. Die Untersuchungen zeigen ebenfalls zum ersten Mal die Verflechtung molekularer Veränderungen im Spermium und den in der Routinediagnostik erfaßten Parameter. Die Beziehung zwischen Membranintegrität und Aktivierung von Caspasen wurde mittels \log_2OR und der positiven Prädiktion gesichert. Nach der Kryokonservierung stiegen beide Parameter signifikant gegenüber dem Ausgangswert an. Der Verlust der Membran-Asymmetrie in den ANMB-positiven Spermien nach dem Auftauen war am häufigsten mit einer Aktivierung der CP9 und einem Motilitätsverlust kombiniert. Jedoch wurde auch die nachgeschaltete CP3 im aktiven Zustand in diesen Spermien gefunden. Es ist somit von einer Aktivierung der gesamten Signalkaskade in Teilpopulationen von Spermatozoen nach einer Kryokonservierung auszugehen. Interessanterweise war aCP3 in einem geringen Prozentanteil der Spermien mit intakter Membran ohne EPS nachweisbar. Neuere Untersuchungen zur Regulation der Caspasen zeigten einen von der aCP3 ausgehenden Autoamplifikations-Mechanismus [45], der aCP3 zur vollstän-

digen Aktivierung von CP8 erfordert [46]. Damit verfügen die ejakulierten Spermien über das notwendige Inventar zur Signaltransduktion bei der Apoptose. Die komplette Aktivierung bedarf jedoch äußerer und/oder innerer Stimuli [47].

Akquiriert werden diese Enzyme wahrscheinlich während der Spermatogenese. Mit zunehmender Ausreifung könnte eine Deaktivierung erfolgen. Eine unzureichende Ausreifung, d. h. fehlerhaftes zytoplasmatisches und nukleäres Remodelling oder Reaktivierung, könnten dann der Ausgangspunkt für eine Aktivierung der Enzyme mit weitreichenden Konsequenzen für die fertile Kapazität sein. Die Präsenz von Elementen des Typ I-Weges über aCP8 im Zytosol wie auch des Typ II-Signalweges über aCP9 am Mitochondrium und der gemeinsamen Endstrecke über CP3 ermöglicht theoretisch unterschiedliche Störungen der Spermienfunktionen. Inwieweit CP3 tatsächlich die dicht gepackte DNA eines ejakulierten Spermatozoons fragmentieren und zu einer Verminderung der Fertilisierungsraten führen kann, ist noch unklar [48]. Caspase 3 spaltet aber eine solche Vielzahl von Substraten (250 nachgewiesen, bis 400 vermutet), daß von weitreichenden Konsequenzen im Falle einer Aktivierung ausgegangen werden muß, z. B. verminderten DNA-Fragmentationen in Spermien die Fertilisierungsraten in der IVF [6] und ICSI [7]. Der Zusammenhang zwischen Membranintegrität und Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden läßt neue An-

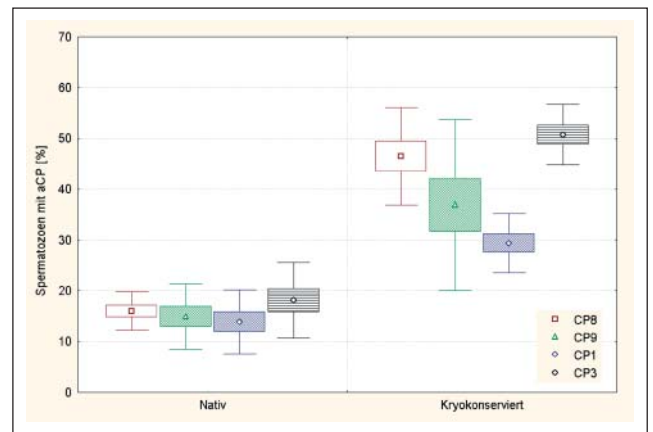


Abbildung 4: Prozentualer Anteil nativer und kryokonservierter Spermien mit aktiven Caspasen 8, 9, 1 und 3 vor der immunmagnetischen Zellseparation (MACS).

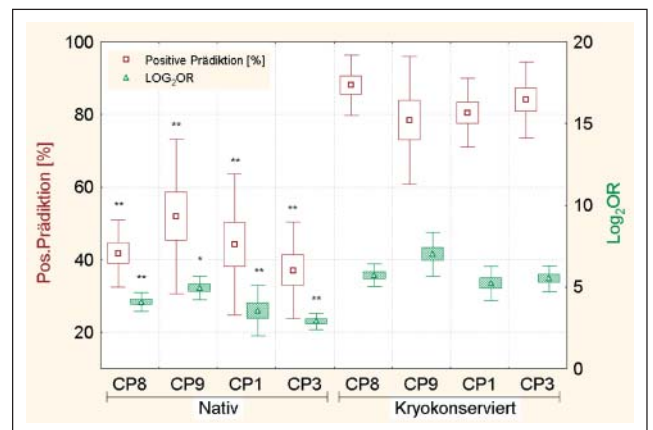


Abbildung 5: Das \log_2OR und die positive Prädiktion der CP 8, 9, 1 und 3 von nativen und kryokonservierten Spermien, t-Test für gepaarte Stichproben, Differenzen zu den kryokonservierten Proben signifikant $**p < 0,01$, $*p < 0,05$.

sätze zur Verbesserung der Erfolgsraten in der assistierten Reproduktion erwarten, indem Annexin V bindende Spermien aus einem Ejakulat entfernt werden. Es ist dabei von Vorteil, daß nur die zu eliminierenden Spermien die Magnetbeads binden. Weiterhin erklären diese Untersuchungsergebnisse die reduzierte Fertilitätskapazität kryokonservierter Spermien.

Förderung

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Gl 199/1-4) und (PA 834/1-1) sowie Mitteln der Universität Leipzig (IZKF 2399) erbracht.

Literatur:

1. Francavilla S, D'Abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozone S, Gnassi L, Arizzi M, Ulisse S. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2692–700.
2. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; 207: 202–5.
3. Host E, Lindenberg S, Kahn JA, Christensen F. DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78: 336–9.
4. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 1999; 276: E310–316.
5. D'Alessio A, Riccioli A, Lauretti P, Padula F, Muciaccia B, De Cesaris P, Filippini A, Nagata S, Ziparo E. Testicular FasL is expressed by sperm cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3316–21.
6. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602–7.
7. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528–32.
8. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31: 1–9.
9. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger CP. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression of early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39–51.
10. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 109–15.
11. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Immunomagnetic preparation of non-apoptotic human sperms. *Andrologia* 2001; 33: 176–7.
12. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Banking* 2001; 2: 127–33.
13. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activation of caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003; 24: 246–52.
14. van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CP. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb Haemost* 1995; 73: 172–9.
15. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000; 243: 167–90.
16. Faleiro L, Lazebnik Y. Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol* 2000; 151: 951–9.
17. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10964–7.
18. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1–16.
19. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43–50.
20. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Ann Rev Biochem* 1999; 68: 383–424.
21. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312–6.
22. Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 20049–52.
23. Jockenhövel F, Lerchl A, Allolio B. Hormone gegen das Altern-Möglichkeiten und Grenzen. *Dt Arztebl* 2001; 98: B1763.
24. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998; 12: 1551–70.
25. Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of the apoptosome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 1999; 274: 22686–92.
26. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; 371: 346–7.
27. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995; 81: 801–9.
28. Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* 1997; 272: 26953–8.
29. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251: 350–5.
30. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 830–9.
31. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061–7.
32. Paasch U, Grunewald S, Wüdrich K, Glander HJ. Caspasen sind assoziiert mit humaner Spermatogenese und Spermien-Apoptose. *Z Hautkr* 2001; 76: 110.
33. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Cryopreservation induced impairment of human sperm plasma membrane is associated with mitochondrial dysfunction. *Andrologia* 2002; 34: 142.
34. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 1997; 57: 1605–13.
35. Gupta S, Radha V, Furukawa Y, Swarup G. Direct transcriptional activation of human caspase-1 by tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 2001; 276: 10585–8.



PD Dr. med. Uwe Paasch

Geboren am 1965 in Plauen/Vogtland. Von 1989 bis 1995 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig. Dezember 1996 Promotion an der Universität Leipzig zum Doctor medicinae summa cum laude. Mai 1999 Clinical Andrologist of the European Academy of Andrology. März 2001 Anerkennung Facharzt für Haut- und Geschlechtskrankheiten. Dezember 2002 Habilitation und Zuerkennung der Facultas Docenti für das Fachgebiet Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Dezember 2002 Academician of the European Academy of Andrology.

Von 1995 bis 1997 AiP, Universitätshautklinik Leipzig, von 1997 bis 2001 AiW, Universitätshautklinik Leipzig. Seit 2001 Oberarzt Universitätshautklinik Leipzig. April 2002 Forschungsaufenthalt Brookings, South Dakota, USA, South Dakota State University Prof. Don Evenson. August 2002 und April 2003 Forschungsaufenthalt Cleveland, Ohio, USA, Dr. Ashok Agarwal, Cleveland Clinic Foundation. März 2003 Hospitation Dermatohistologie, New York, USA, Dr. Phelps, Mt. Sinai Hospital. Mitglied der Deutsche Dermatologische Gesellschaft seit 1997, European Academy of Andrology seit 1999, Deutsche Gesellschaft für Andrologie seit 2001, ESHRE seit 2003.

36. Solary E, Eymin B, Droin N, Haugg M. Proteases, proteolysis, and apoptosis. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14: 121–32.
37. WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 1999.
38. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985; 44: 493–8.
39. Yavetz H, Yogev L, Homonnai Z, Paz G. Prerequisites for successful human sperm cryobanking: sperm quality and prefreezing holding time. *Fertil Steril*. 1991; 55: 812–6.
40. McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG. A comparison of the freezing of human semen in the uncirculated vapour above liquid nitrogen and in a commercial semi-programmable freezer. *Hum Reprod* 1990; 5: 724–8.
41. Paz G, Yogev L, Gottreich A, Rotem R, Yavetz H, Homonnai ZT. The use of an electric freezer in human semen banking. *Eur J Obstet. Gynecol Reprod Biol* 1991; 38: 141–4.
42. Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1081–6.
43. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245–54.
44. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; 144: 281–92.
45. Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Momoi T, Srinivasan A, Nicholson DW, Lazebnik Y, Flavell RA. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med* 2000; 6: 1241–7.
46. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269–90.
47. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 22532–8.
48. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ, Jr., Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001; 16: 1912–21.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)