

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



Aktivierung von Apoptose-Signalkaskaden in ejakulierten Spermatozoen: ein biologischer Faktor der männlichen Infertilität

Paasch U, Glander HJ, Grunewald S

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2005; 2 (3), 136-147

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, DIR, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

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](#)

Aktivierung von Apoptose-Signalkaskaden in ejakulierten Spermatozoen: ein biologischer Faktor der männlichen Infertilität

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

Der als Apoptose benannte, universell in nahezu allen Körperzellen ausführbare, programmierte Zelltod (PCD) ist durch charakteristische Veränderungen der betreffenden Zelle und nachfolgende Phagozytose im Zellverband gekennzeichnet. Caspasen (CP, Cysteiny-Aspartat-spezifische Proteinasen) sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat spalten. Sie spielen auch bei der durch den PCD gesteuerten Ausreifung des humanen Germinalepithels die zentrale Rolle in der Transduktion der apoptotischen Signale. In Abhängigkeit ihrer Reife und der Integrität der Plasmamembran finden sich in ejakulierten Spermatozoen sowohl inaktive als auch aktivierte Caspasen. Funktionell unterscheidet man zwischen Initiatorcaspasen, die am Anfang der Signalkette z. B. Todesrezeptoren nachgeschaltet sind, und Effektorcaspasen, die das Todessignal terminal umsetzen. Die staffelförmige Aktivierung der Caspasen (aCP) erfolgt durch Proteolyse inaktiver Pro-Caspasen (pCP, Zymogene). Bisher sind 14 Vertreter dieser Enzymfamilie in menschlichen Zellen bekannt. Mehr als 250 verschiedene Zellsubstrate werden von CP-3 degradiert, die die entscheidende Rolle in der terminalen Exekution des Todessignales spielt. Die Universalität des Todesprogrammes erfordert zum Erhalt der Gewebshomöostase eine sehr fein ausbalancierte Kontrolle auf molekularer Ebene, reguliert durch endokrine, physikalische und biochemische Faktoren. Im Germinalepithel ermöglicht die Aktivierung und exakte Regulation der Caspasen die Steuerung der Reifung männlicher Gameten. Störungen dieses Maturationsprozesses führen u. a. zu DNA-Fragmentationen, zu morphologisch unreifen Spermatozoen mit zytoplasmatischen Droplets oder auch zu eingeschränkter Funktion beim ejakulierten Spermatozoon. Neue Einblicke in die molekulare Steuerung der Differenzierung des Germinalepithels werden die Entwicklung des physiologischen Verständnisses und pathophysiologischer Konzepte stimulieren. Caspasen spielen auch bei der immunologischen Infertilität, der Varikozele und bei der Hodentorsion eine wesentliche Rolle. Die zielgerichtete Blockade oder Stimulation der apoptotischen Signaltransduktion wird es außerdem ermöglichen, innovative Ansatzpunkte zur Kontrazeption bzw. Therapie der Infertilität zu entwickeln.

Schlüsselwörter: Apoptose, Caspasen, Infertilität, humane Spermatozoen

Role of Apoptosis Signal Transduction in Male Infertility. Apoptosis is characterised by a variety of changes resulting in the recognition and phagocytosis of apoptotic cells. Caspases (cysteiny-aspargate-specific proteinases) play a central role in the regulation of apoptosis in the human seminiferous epithelium. They are expressed as inactive proenzymes and participate in a cascade triggered in response to pro-apoptotic signals. To date, 14 caspases have been implicated in the human apoptotic pathway cascade. Among these, caspase-3 is considered to be a major executioner protease. Caspases are known not only to interact with each other but they may also connect different signaling systems. The role of subtypes of caspases and pathways used in ejaculated sperm as well as their impact on physiological phenomena such as capacitation still remains a subject of controversy. Recent results underline that there is no functional relevance of Fas in mediating caspase activation in human ejaculated spermatozoa. While spermatozoal mitochondria are highly susceptible to specific agonists of apoptosis such as betulinic acid via caspase activation, ROS-induced apoptosis appears to be caspase-independent. Since apoptosis is a universal suicide system in almost all cells, a close control via molecular, endocrinal and physical factors establishes homeostasis of cell growth and death. The proper regulation of the caspase cascade plays an important role in sperm differentiation and testicular maturity. However, caspases have been implicated in the pathogenesis of multiple andrological pathologies such as impaired spermatogenesis, decreased sperm motility and increased levels of sperm DNA fragmentation, testicular torsion, varicocele and immunological infertility. Future research may provide a better understanding of the regulation of caspases, which may help us manipulate the apoptotic machinery for therapeutic benefits. In this review, we summarise the consequences of caspase activation, aiming to clarify their role in the pathogenesis of male infertility. *J Reproductive Med Endocrinol* 2005; 2 (3): 136–47.

Key words: apoptosis, caspases, male infertility, human sperm

Der als Apoptose (apo = ab, weg, los; ptosis = Senkung; stammt aus dem Griechischen und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst) bezeichnete programmierte Zelltod (programmed cell death, PCD) ist ein zur vollständigen Elimination einer Zelle führendes „Selbstmordprogramm“.

Der Zelltod an sich wurde sehr lange als ein grundsätzlich negatives Ereignis für den Organismus betrachtet, obwohl bereits im vorigen Jahrhundert Histologen auf diese Art der Eliminierung einzelner Zellen im Rahmen der Organentwicklung stießen, sie als Karyorrhesis, Karyopyknose oder Karyolysis beschrieben und damit frühzeitig vom Unfalltod, der Nekrose, abgrenzten.

Nachdem der aus Gießen stammende Carl Vogt 1842 [1] im politischen Exil in Neuchâtel (Schweiz) erste Untersuchungen zum Zelltod publiziert hatte, wurde in Deutschland zuerst aus Kiel (W. Flemming, ca. 1890) und Leipzig

über diese Art des Zelltodes berichtet [2]. Im Laufe von knapp 50 Jahren entstanden in der Heimat Helms die Hälfte der ein Dutzend zählenden Publikationen zum Thema [3].

Nach der detaillierten Beschreibung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose durch die Pathologen Kerr, Currie und Wyllie der Universität Edinburgh in den Jahren 1971 bis 1972 [4, 5] wurde die physiologische Zellelimination als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods erkannt, hierfür der Begriff Apoptose geprägt und als biologisches Konzept der Mitose gegenübergestellt. Heute ist bekannt, daß das universelle Todesprogramm in fast allen Körperzellen aktivierbar ist und beim Menschen die Homöostase von Germinal- und Sertoli-Zellen kontrolliert.

Der PCD wird morphologisch an somatischen Zellen durch Kondensation und Fragmentation des Chromatins,

Eingegangen: 13.04.2005; akzeptiert nach Revision: 16.08.2005

Aus dem Europäischen Ausbildungszentrum für Andrologie, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig
Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Hans-Jürgen Glander, Andrologie, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie Leipzig, Europäisches Ausbildungszentrum für Andrologie, D-04103 Leipzig, Stephanstraße 11; E-Mail: hans-juergen.glander@medizin.uni-leipzig.de

die Schrumpfung zellulärer Organellen, die Dilatation des endoplasmatischen Retikulums und eine allgemeine Zeiose einhergehend mit Alterationen der Zellmembran sichtbar. Final wird die in Apoptose befindliche Zelle als solche von Nachbarzellen erkannt, die die residualen Bestandteile phagozytieren. Eine Entzündungsreaktion bleibt immer aus [6].

Zahlreiche Studien belegen eindrucksvoll die zentrale Rolle der Caspasen (cysteinyln aspartate-specific proteinases, CP), zytosolische Proteasen mit Aspartatspezifität, bei der Transduktion und Exekution des PCD. Zahlreiche Varianten dieser Enzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität arrangieren sich zu einer Signalkette, um aus einem Todes-signal einen unumkehrbaren Prozeß zu formen.

Eingeleitet werden kann die Apoptose durch Bindung spezifischer Liganden an membranständige Todesrezeptoren, charakteristische Veränderungen am Mitochondrium, zellulären Streß, vermittelt durch z. B. reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), Dysbalance der Kalziumhomöostase oder aber vermittelt einer Quervernetzung (Cross-talk) mit anderen Signalsystemen (Calpastatin-Calpain-System) [7].

Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über den Stand wesentlicher Erkenntnisse zu den Mechanismen der Aktivierung von Apoptosesignalen in ejakulierten Spermatozoen. Mögliche Bedeutungen der Caspaseaktivierung in der Pathogenese der männlichen Infertilität werden im Kontext von DNA-Fragmentation, Membranschädigungen und Störungen mitochondrialer Funktionen ejakulierter Spermatozoen aufgezeigt.

Caspasen sind die zentralen Elemente der Apoptose

Das Hauptsystem der apoptotischen Signaltransduktion und -exekution sind die infolge ihrer Substratspezifität zu einer hierarchischen Kaskade arrangierten Caspasen. Caspasen werden als weitgehend inaktive Zymogene oder Pro-Caspasen (pCP) exprimiert und im Verlauf der Signalvermittlung durch selektive Proteolyse oder Autoaktivierung aktiviert (aCP; Abb. 1).

Obwohl die Mehrheit dieser Proteasen im Zytoplasma lokalisiert ist, finden sich solche Enzyme auch an der Kernmembran, im Kern, am Golgi-Apparat (CP-12) oder an den Mitochondrien (CP-9, -3 und -2) [9]. Die Selektivität der Aktivierungskaskade ergibt sich infolge der spezifischen Peptidmotive, die alle Enzyme erkennen [10]. Fällt in der Kaskade eine CP aus, kann eine andere ersetzend eingreifen [11].

Die Weitergabe des Signals durch bereits aktivierte Caspasen kann durch Aktivatoren und Inhibitoren moduliert, beschleunigt oder abgestoppt werden [12]. Derzeit sind 14 Mitglieder der Caspasenfamilie beim Menschen bekannt. Caspase-3 nimmt die zentrale Rolle als terminale Effektorcaspase ein.

Die CP bilden überwiegend eine Familie hochspezifischer Heterotetramere mit zwei katalytischen Zentren. Entsprechend der zeitlichen Reihenfolge ihrer Publikation erfolgte die Numerierung. Zu Beginn wurde das ICE (interleukin 1 β -converting enzyme) entdeckt, welches heute als CP-1 bezeichnet wird [13].

Der Zusammenhang zwischen Caspasen und dem PCD wurde auf molekularer Ebene mittels Studien der Nematode *Caenorhabditis elegans* hergestellt [14]. Mehr als 12 Gene sind bei diesem Wurm während der Entwicklung am Tod und an der Elimination von 131 der 1090 Zellen beteiligt [15]. Für jedes dieser *Caenorhabditis elegans*-Gene wurden Analoga bei Säugern gefunden [16].

Konstitutiv und ubiquitär als Zymogen bzw. Proenzym (30–50 kDa) synthetisiert, bestehen sie aus einer variablen Prodomäne, einer großen (20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (10 kDa). Die Heterotetramerstruktur aktivierter Caspasen entsteht durch Abtrennung der Prodomäne und Zusammenlegen von zwei mal zwei Untereinheiten mit zwei unabhängig funktionierenden katalytischen Einheiten [17].

Hinsichtlich ihrer Funktion unterscheidet man Initiatorcaspasen (CP-8, -9 und -10), die mit speziellen Adapterproteinen interagieren (DED: death effector domain; CARD: caspase recruitment domain), von Effektorcaspasen (CP-3, -6 und -7; Tab. 1) [18]. Ersterer leiten initiale proapoptotische Stimuli durch Spaltung und Aktivierung untergeordneter Caspasen im Sinne einer Signalkaskade weiter. Die Initiatorcaspase-8 initiiert überwiegend die Signaltransduktion im rezeptorvermittelten Typ-I-Weg, während CP-9 für die mitochondriale Apoptose (Typ II) und CP-12 für die Vermittlung durch zellulären Streß (Typ III) erforderlich sind [19]. CP-3 ist die wichtigste der Effektorcaspasen, ihre Aktivierung markiert unumstößlich den Tod der Zelle, sobald eine kritische Masse aktivierten Enzymes in der Zelle vorliegt [20]. Während der

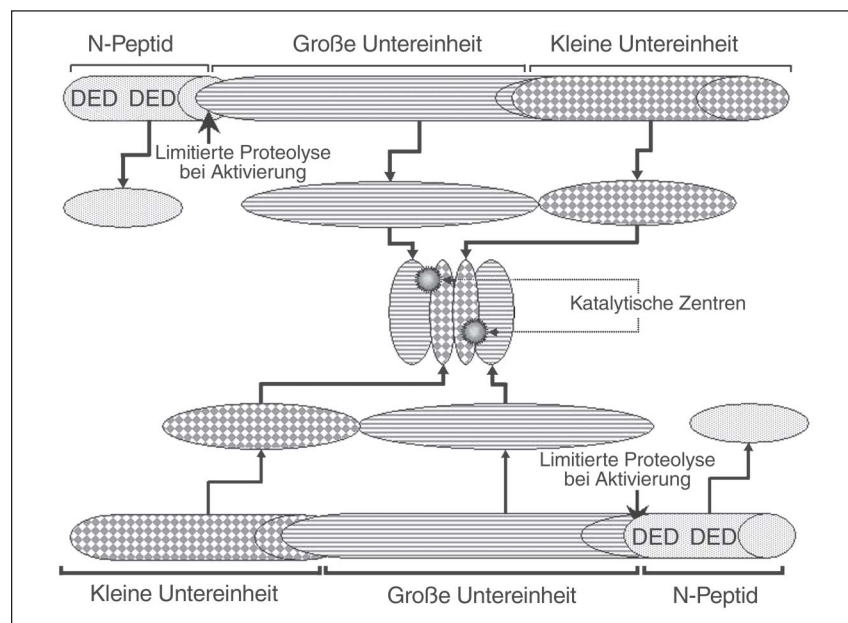


Abbildung 1: Eine Aktivierung der Caspasen erfolgt in der Mehrzahl der Familienmitglieder dieser Enzyme via Abtrennung der Prodomäne mittels limitierter Proteolyse. Diese wird infolge proapoptotischer Signale gestartet. Die nachfolgende Assoziation zweier dimerer Untereinheiten (je eine große und eine kleine Untereinheit) zur aktiven Heterotetramerstruktur mit zwei katalytischen Zentren führt zum vollständig aktivierten Enzym. Stark vereinfachtes Modell, verändert nach [8]. DED: Death Effector Domain

terminalen Exekution werden zahlreiche wichtige Zellstrukturproteine und Reparaturenzyme der DNA und diese selbst abgebaut (z. B. PARP, Lamin B, Histon H1).

Die Substratspaltung führt letztlich zur Unterbrechung von Signalübertragungen, Inhibition der Genexpression, Arretierung des Zellzyklus, zum Verlust von DNA-Reparaturfunktionen, zur Fragmentierung chromosomaler DNA und schließlich zum Abbau nukleärer und zytoplasmatischer Strukturproteine und damit zu den typischen morphologischen Merkmalen apoptotischer Zellen.

Die Blockade oder Aktivierung von CP waren die ersten Ansatzpunkte potentieller therapeutischer Interventionen [21]. Tierexperimentelle Studien belegen die protektive Bedeutung von Caspaseinhibitoren beim Herzinfarkt, beim neuronalen Zelltod, bei rheumatischen Erkrankungen oder bei der Organtransplantation, während die Induktion der blockierten Apoptose Ziel der experimentellen Tumorthherapie ist [22]. Entsprechende Untersuchungen am Germinalepithel waren ebenfalls erfolgreich [23].

Aktivierungswege der Caspasekaskade

Initiatorcaspasen werden zunächst durch Protein-Protein-Interaktionen aktiviert. Die Signalwege münden dann nach Überwindung zahlreicher Sicherungsmechanismen in einen terminalen Exekutionsmechanismus, der Aktivierung von Effektorenzymen, die ihrerseits unumkehrbar den Zelltod einleiten (Abb. 2).

Tabelle 1: Wesentliche funktionelle Zuordnung der Caspasesubtypen und die dazugehörigen Proteininteraktionsstrukturen ihrer Prodomänen

Funktion	Caspasesubtyp	Prodomäne und Adapterelement
Initiatorcaspasen	Caspase-8, -9, -10	lang: DED (-8, -10) oder CARD (-2, -9)
Effektorcaspasen	Caspase-3, -6, -7	kurz: ohne DED oder CARD
Zytokinprozessoren	Caspase-1, -4, -5, -11, -14	lang: CARD

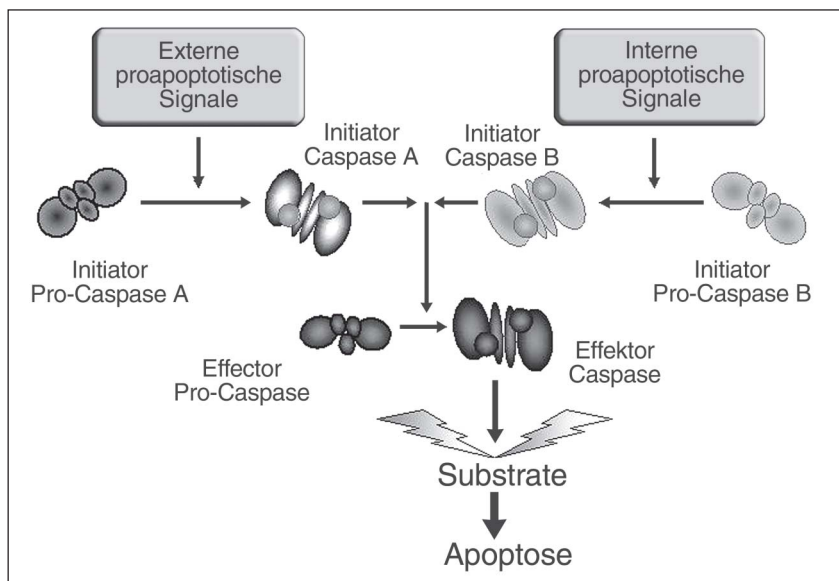


Abbildung 2: Modell der Signalübermittlung in der Caspasekaskade des programmierten Zelltodes. Heterotetramere Effektorcaspasen werden durch vorgeschaltete heterotetramere Initiatorcaspasen aktiviert, wenn diese zuvor aktiviert worden sind. In Abhängigkeit des Ursprunges der Todessignale (intern oder extern) werden unterschiedliche Caspasesubtypen aktiviert. Daraus ergeben sich bevorzugte Signalwege, die jedoch auch partiell überlappend genutzt werden können. Verändert nach [16]

Aktivierung durch Todesrezeptoren

Dieser Signalweg wird durch eine Familie membranständiger Todesrezeptoren vermittelt. Sie transmittieren ein von außen kommendes zytotoxisches Signal in einem triphasischen Prozeß [24]. Nach Aktivierung einer Initiatorcaspase via Todesrezeptor erfolgt überwiegend die variable mitochondriale Amplifikation und final die Aktivierung der Effektorcaspasen [25].

Aktiviert werden die membranständigen Todesrezeptoren der TNF-(Tumor-Nekrose-Faktor)-Rezeptorfamilie wie Fas (Synonyme: CD95, APO-1), TNF-Rezeptor und DR3-6 durch spezifische Liganden (FasL, TNF- α und TNF-related apoptosis-inducing ligand – TRAIL).

Die Bindung dieser Liganden an ihren entsprechenden Rezeptor führt nach Rekrutierung der spezifischen Adaptermoleküle zur Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 oder -10 [26].

Fas enthält im zytoplasmatischen Teil eine konservierte Proteindomäne („death domain“, DD), die nach der Trimerisierung von Fas durch Bindung von FasL eine Ankopplung des Adaptermoleküls FADD (Fas-associated protein with (death domain) ermöglicht [27]. FADD weist ebenso wie der Rezeptor eine DD auf, mit der es an die komplementäre DD des Rezeptors bindet. Zusätzlich verfügt es über eine DED (death effector domain), die Pro-Caspase-8 via homophiler DED-DED-Bindung rekrutiert und in die aktive Form überführen kann [28].

Der Komplex aus Liganden, Rezeptoren und Adaptermolekülen wird als DISC (death-inducing signaling complex) zusammengefaßt, an dem große Mengen aktiver Caspase-8 innerhalb von Sekunden generiert werden können. Daraus resultiert eine effiziente Aktivierung der Effektorcaspasen [29].

Zunächst wurde angenommen, daß die Fas/FasL-medierte Apoptose des männlichen Germinalepithels wesentlich zur Homöostase von Sertoli-Zellen und der von ihnen betreuten Germinalzellen beiträgt [30–33]. Spätere Studien belegen jedoch, daß dieses System bei Applikation verschiedener apoptotischer Stimuli nicht zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt [34, 35]. Insbesondere methodische Probleme erschwerten bisher die exakte Aufklärung der Signalvermittlung der beteiligten Zellen [36].

Das TNF-Rezeptorprotein findet sich mehrheitlich in den Sertoli-Zellen, während der Ligand vom Germinalepithel bereitgestellt wird. Indirekt, über eine Down-Regulation von FasL, soll sich dieses System jedoch in der Kontrolle der Germinalzellreifung auswirken [37]. Untersuchungen am Germinalepithel von Infertilitätspatienten zeigten eine ausgeprägte Präsenz von Fas im Germinalepithel, je-

doch ohne Assoziation zum Johnson-Score [38]. Der Nachweis von Fas auf ejakulierten Spermatozoen wurde als abortive Form des PCD eingestuft [39]. Eigene Untersuchungen an ejakulierten Spermatozoen mit verschiedenen Methoden (Western-Blot, Immunocytochemie, direkte Immunfluoreszenz, Induktion und FACS) lieferten in Abhängigkeit der untersuchten Proben (kryokonserviert vs. nativ; Patienten vs. Probanden) jedoch kein einheitliches Bild, sodaß im Ejakulat wahrscheinlich nur eine kleine Subpopulation abortiv apoptotischer (Fas⁺) Zellen zu erwarten ist [38, 40, 41].

Mitochondriale Apoptose

Zahlreiche apoptotische Stimuli wirken primär und direkt am Mitochondrium [42]. Cytochrom-C (CyC), Bestandteil der Atmungskette im Mitochondrium, ist der entscheidende Faktor, der bei der Aktivierung dieses Signalweges ins Zytoplasma freigesetzt wird. Es folgt der Zusammenbruch des transmembranösen mitochondrialen Potentials $\Delta\psi_m$, welches ca. -180 mV beträgt [43]. Im Säugerhoden wird sowohl somatisches als auch hodenspezifisches CyC exprimiert, welches im Zytoplasma zusammen mit Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor), dATP/ATP und pCP-9 das Apoptosom bildet [44]. Aktivierte CP-9 ist zusätzlich in der Lage, die z. T. ebenfalls in den Komplex integrierte pCP-3 zu aktivieren [45]. Unabhängig hiervon bewirkt CyC die direkte Oxidation von innenseitig-membranständigem Phosphatidylserin (PS). Es resultiert eine Hemmung der membranassoziierten Aminophospholipidtranslokase mit dem Ergebnis eines sich selbst perpetuierenden Verlustes der Membranasymmetrie und einer konsekutiven Externalisation von PS (EPS) [46]. Daneben können Mitochondrien den AIF (apoptosis-inducing factor) freisetzen, der direkt auf Membranen und die DNA einwirken kann [47]. Der gesamte Prozeß der apoptotischen Signaltransduktion am Mitochondrium wird durch zahlreiche pro- und antiapoptische Proteine u. a. der Bcl-2-Familie reguliert [48].

Die Aktivierung von CP-9, der Zusammenbruch des $\Delta\psi_m$ und die Freisetzung von CyC und AIF sowie die Präsenz zahlreicher regulatorischer Proteine sind am Spermatozoon dokumentiert [41, 49–53].

Streßvermittelte Apoptose

Wirken innere und äußere Einflüsse auf eine Zelle, kann der Verlust der Homöostase des Kalziums unter Aktivierung der Caspasen-7 und -12 die Apoptose am endoplasmatischen Retikulum initiieren [54]. CP-12 wird hierbei direkt unabhängig von Apaf-1 und CP-9 aktiviert [55]. Thapsigargin, ein Inhibitor der sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulum- Ca^{2+} -ATP-ase (SERCA), führt nach Applikation an Spermatozoen zu einem sofortigen Kalziumeinstrom, zur Akrosomenreaktion neben einer Abnahme der Motilität, gefolgt von einem schnellen Absterben der Zellen [56]. Der PCD als Antwort auf zellulären Streß wird am Hoden zusätzlich durch Fas und p53 vermittelt. Dabei kommt dem Fas/FasL-System eine Bedeutung bei Einwirkungen von chemischen oder zytotoxischen Substanzen [57] und p53 bei Schädigungen durch Radiatio am Hoden zu [58]. Die Aktivierung des p53-Bax-Signalweges wurde bei experimenteller Vasektomie (Ratten) nachvollzogen [59].

Alternative Signalwege

Alternative, auch caspaseunabhängige Signalwege des PCD wirken über Fettsäuren und deren Oxidationsprodukte. Somit ist es wahrscheinlich möglich, unter Umge-

hung anderer proteingebundener Signaltransduktionen direkt am Mitochondrium die Freisetzung von CyC und damit den Zelltod zu bewirken [60]. Die Vermittlung des PCD durch Ceramide ist neben Neurotoxinen für Zytostatika nachgewiesen [61]. Während der Spermatogenese entstehen z. B. größere Mengen an Ceramiden, bevor CP-3 aktiviert wird. Die direkte Modifikation der Lipidkomposition kryokonservierter Spermatozoen mit quantitativer Zunahme von Lysophosphatidylcholinen und Ceramiden sowie der konsekutiven apoptotischen Membranveränderungen konnte ebenfalls gezeigt werden [62, 63].

Über den ebenfalls am Mitochondrium freigesetzten AIF kann eine Aktivierung von CP-3-ähnlichen Caspasen (CP-6 und -7), gefolgt von einer EPS im Kontext mit der DNA-Fragmentierung direkt erfolgen [64]. Die finale Aktivierung von CP-3 und die CyC-Freisetzung am Mitochondrium perpetuieren dann die EPS an der Membran. Die besondere Suszeptibilität der Mitochondrien ejakulierter Spermatozoen gegenüber spezifischen apoptotischen Stimuli zeigt sich anhand der Freisetzung von AIF und des Zusammenbruches des $\Delta\psi_m$ [50, 52].

Abweichende Signalwege werden auch bei der Schädigung von Zellen durch reaktive Sauerstoffspezies beobachtet [65]. Hier entscheidet die aktuelle Energiebilanz über den Weg des Zellunterganges (PCD, sekundäre Nekrose nach primärer apoptotischer Signaltransduktion oder primäre Nekrose). Am ejakulierten Spermatozoon scheint sich die schädigende Wirkung von ROS direkt an der Membran, den Mitochondrien und der DNA zu manifestieren, obwohl CP-9 und CP-3 partiell auch aktiviert werden [53, 66].

Vernetzung der Signalwege

Regulatorische Proteine stellen zudem weitere Zielstrukturen von Caspasen dar. Durch die Spaltung von Bid zu proapoptotischem tBid (truncated Bid) wird ein mitochondrialer Amplifikationsweg rezeptorvermittelter Apoptose via Apaf-1/CP-9 realisiert [67]. tBid transloziert direkt zum Mitochondrium und führt zur Freisetzung von proapoptotischem Bax/Bak unter konsekutiver Bildung des Apoptosoms [68]. Bei der streßvermittelten Signaltransduktion der Apoptose werden verschiedene Kinasen (MEK-Kinase 1, Mst1 und p21-aktivierte Kinase2/hPak65) durch Caspasen aktiviert und liefern ein Amplifikations-signal via c-Jun-Kinase [69]. Damit werden sogenannte Cross-talks der Signalwege und Verstärkermechanismen (amplification loops) erschlossen. Die direkte Spaltung von pCP-9 durch aCP-3 sowie von pCP-3, -8 und -10 durch aCP-6 autoamplifiziert direkt die terminale Exekution [70].

Kontrolle der Signalkaskaden

Die Aktivierung der Signalkaskade kann von verschiedenen Startpunkten aus geschehen. Einmal aktiviert, unterliegt sie aufgrund der Kaskadenstruktur einer Eigendynamik und endet mit dem zielgerichteten Tod der Zelle. Ein solches System muß daher fein ausbalanciert werden, soll es nicht zur Gefahr für seinen Träger werden. Hierfür gibt es an zahlreichen Angriffspunkten Regulatoren. Während die Proteine der Bcl-2-Familie direkt an der Signalkaskade beteiligt sind (Tab. 2), inhibieren sogenannte inhibitors of apoptosis (IAP, virale Proteine) direkt die Caspasen. FLIP, endogene FADD-ähnliche Inhibitoren, die auch mit den CP interagieren, weisen Analogien zu viralen Inhibitoren auf (Abb. 3).

Tabelle 2: Einordnung ausgewählter Proteine der Bcl-2-Familie hinsichtlich ihrer Funktion, Bcl-2-Homologien (BH) und Lokalisation

Antiapoptotisch Integrale Membranproteine der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns		Proapoptotisch Im wesentlichen im Zytosol lokalisiert oder zytoskelettassoziiert, translozieren während der Apoptose an die mitochondriale Membran	
Bcl-2-Subfamilie Bcl-2, Bcl-x _L , Bcl-w Mcl-1, A1/BFL-1 BOO/DIVA	Sequenzhomologien BH1–4	Bax-Subfamilie Bax, Bak, BOK/MTD BH3-Subfamilie BIK/NBK, BIM/Bod, Bid, Bad, BLK, Hrk Andere Bcl-x _S	Sequenzhomologien BH1–3 Sequenzhomologien BH3 Sequenzhomologien BH1 und 4

FADD-like ICE inhibitory proteins – FLIP

FLIP sind endogene CP-Inhibitoren mit Analogie zu IAP. Sie interferieren mit FADD-CP-8-Interaktionen, wodurch die Aktivierung von CP-8 im DISC gehemmt wird [71]. Viren nutzen diese Strategie zum Erhalt der Herstellung ihrer Proteine, während in Tumoren die Apoptose der Tumorzellen verhindert wird [72, 73].

Regulatoren der Bcl-2-Familie

Die Segregation von Apaf-1 und CyC an der intakten äußeren mitochondrialen Membran wird durch die Proteine der Bcl-2-Familie gesteuert, um die Aktivierung assoziierter Caspasen zu regulieren.

Das Protein Bcl-2 ist an der zytoplasmatischen Seite der mitochondrialen Membran, am endoplasmatischen Retikulum und an der Kernmembran zu finden [74]. Es schützt die Zelle vor γ - und UV-Strahlenschäden, Zytokinentzug, den Wirkungen von Dexamethason und Stauroporin sowie zytotoxischen Medikamenten [75]. Die proapoptotischen Mitglieder Bid, Bak und Bax sind in vielen Zellarten als latente Induktoren der Apoptose enthalten.

Viele Proteine der Bcl-2-Familie können zudem mit ihren Familienmitgliedern Dimere bilden [76]. Antiapoptoti-

sche Bcl-2-Mitglieder können auf diese Weise die Funktion proapoptotischer Mitglieder und umgekehrt inhibieren. Alle wichtigen Proteine dieser Familien mit Ausnahme von Bcl-2 wurden am humanen Hoden und am ejakulierten Spermatozoon nachgewiesen [38].

Inhibitors of apoptosis (IAP)

Die IAP repräsentieren Proteine, die die Exekution der Apoptose in z. B. viral infizierten Zellen blockieren. Die Familie der IAP-Gene ist evolutionär konserviert. Ihre Produkte sind an der Regulation des PCD vom Insekt bis zum Menschen beteiligt. Überexpression führt zur Unterdrückung der Signaltransduktion innerhalb der Signalkaskade. Humane X-chromosomal gebundene IAP (XIAP) inhibieren direkt CP-3 und CP-7 [77].

Verlust der Membranasymmetrie

Im Rahmen der Apoptose bricht die Membranasymmetrie der Phospholipide infolge enzymatischer Defizienz zusammen, und es kommt zu einer Externalisierung von Phosphatidylserin. Das an der Außenseite der Membran erscheinende Phosphatidylserin markiert hochspezifisch eine in Apoptose befindliche Zelle [78, 79]. Makrophagen sind über einen Rezeptor fähig, phosphatidylserintragende Zellen (EPS⁺) als apoptotisch zu erkennen und zu phagozytieren [80]. Entscheidend für den Verlust der Asymmetrie der Membran ist die Aktivierung der Scramblase [81]. Die Proteinkinase C δ , ein Substrat von Caspase-3, aktiviert sie via Phosphorylierung. Dabei überführt die Abspaltung des regulatorischen Teils des Enzyms die katalytische Unter-einheit in einen dauerhaft aktiven Zustand [82]. EPS wird als frühes Ereignis der Exekutionsphase der Apoptose eingeschätzt [83]. Die spezifische Bindung von Annexin V (35–36 kDa), einem phospholipidbindenden Protein, an das EPS ermöglichte den Aufbau selektiver Nachweis- und Separationssysteme für ejakulierte Spermatozoen [84–86].

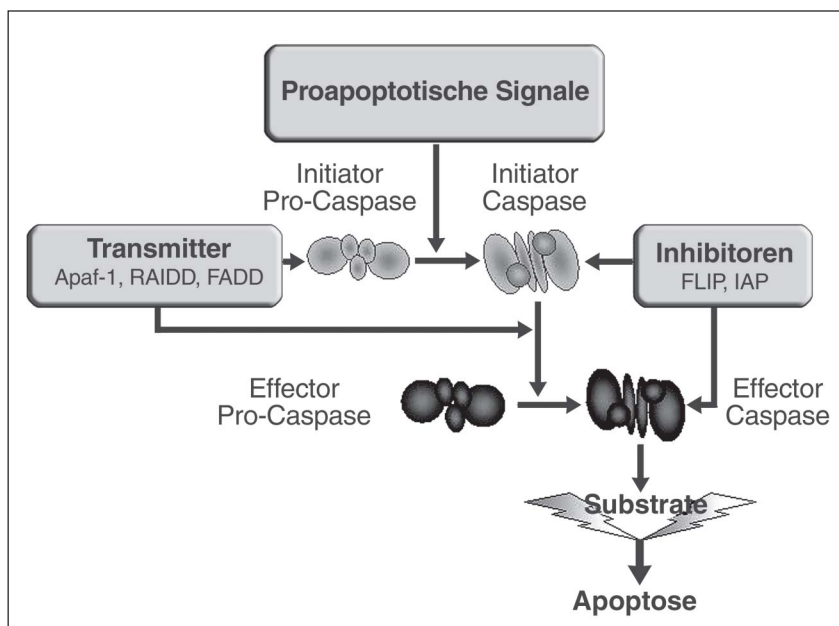


Abbildung 3: Modell der Regulation der Aktivierung von heterotetrameren Caspasen. Das Todes-signal wird durch Transmitter und Inhibitoren verstärkt, abgeschwächt oder gestoppt. Transmitter: APAF-1 = apoptotic protease activating factor, RAIDD = RIP-associated ICH-1 /CED3 homologous protein with death domain, FADD = Fas-associated protein with death domain; Inhibitoren: FLIP = FADD-like ICE inhibitory proteins, IAP = inhibitor of apoptosis. Verändert nach [16]

Kontrolle der nukleären Degradation

Der Abbau der DNA erfordert zunächst eine Überwindung des exakt geregelten Zellzyklus. Wichtige Elemente der Kontrolle sind das Tumorsuppressorprotein p53, das Onkoprotein MDM2 und die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP).

Tumorsuppressor p53

In normal wachsenden Zellen kaum nachweisbar, wird das p53-Tumorsuppressorprotein durch DNA-Schäden (γ -Strahlen, Chemotherapeutika) oder die Aktivierung von Onkogenen induziert. Zum Schutz des Organismus vor einer möglichen Entartung der Zelle kann p53 bei genomischem Streß durch Arretierung des Zellzyklus weitere Zellteilungen verhindern und DNA-Reparaturvorgänge aktivieren. Liegen irreparable DNA-Schäden bzw. eine andauernde Onkogenaktivierung vor, kann es eine Elimination der Zelle durch Initialisierung von Apoptose bewirken. Es ist in 50–60 % aller Tumorerkrankungen, auch der des Hodens, durch Deletionen, Punktmutationen oder virale Interaktionen verändert [87]. Insbesondere nach thermischer Schädigung wird p53 im Hoden hochreguliert [88]. Das Fas-Gen, CP-1 und Proteine der Bcl-2-Familie werden von p53 transkriptionell kontrolliert [89]. Nach Aktivierung von CP-1 folgt die Weitergabe des Signals an CP-3 [90]. Alle an dieser Form der Signaltransduktion beteiligten Proteine wurden am Hoden sowie partiell in ejakulierten Spermatozoen nachgewiesen [91, 92].

Mouse Double Minute 2 (MDM2)

Das Onkoprotein MDM2 (mouse double minute 2; 90 kDa) kann seinerseits p53 binden und inhibieren. Der Kern-Zytoplasma-Transport von MDM2 ist für die Markierung des p53-Moleküls zum Abbau erforderlich [93]. Als Substrat von CP-3 wird MDM2 wiederum durch Effektorcaspasen deaktiviert [94]. Das erstmals in Mäusen identifizierte Protein ist im humanen Hoden präsent und kann bei Hodentumoren des Menschen überexprimiert werden [95, 96]. MDM2 findet sich ebenfalls in ejakulierten Spermien [38].

Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)

Ein weiteres Zielprotein der Caspasen ist die PARP, ein Reparaturenzym, das spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet, die durch die Einwirkung der Nukleasen bei beginnender Apoptose entstehen. Infolge von Schädigungen der DNA knüpft aktiviertes PARP Poly-(ADP-Ribose)-Reste unter Verbrauch von ATP und NAD^+ an nukleäre Proteine und interagiert mit DNA-Polymerase- α . Es ist ein hochkonserviertes nukleäres Enzym, das aus einer DNA-Bindungsdomäne, einer Automodifikationsdomäne und einer katalytischen Domäne besteht. PARP wird durch CP-3 in zwei Bruchstücke von 89 kDa (katalytisches Fragment) und 24 kDa (DNA-Bindungsfragment) gespalten und inaktiviert. Da diese proteolytische Spaltung von PARP nur beim apoptotischen Zelltod auftritt, kann man Apoptose eindeutig von Nekrose (Fragmente von 40–70 kDa) unterscheiden [97–100]. Die apoptotische PARP-Spaltung wurde am Hoden, nicht jedoch am ejakulierten Spermatozoon (Fragmente um 60 kDa) nachgewiesen [38, 52].

Elemente des PCD in ejakulierten Spermatozoen

Fas/FasL

Weniger als 10 % der ejakulierten Spermatozoen gesunder Männer tragen Fas. Proben mit einer Oligozoospermie hingegen können über 50 % Fas⁺-Zellen beinhalten [101]. Eigenen Untersuchungen zufolge liegt die Frequenz in beiden Gruppen jedoch deutlich niedriger $2,5 \pm 1,5$ % vs. $6,4 \pm 4,6$ % [41, 102]. Aus dem eher sporadischen Vorhandensein von Fas auf ejakulierten Spermato-

zoen wurde der Schluß gezogen, daß es sich um eine Subpopulation von Zellen im Ejakulat handelt, die aufgrund einer abortiven Apoptose während der Spermato-genese im Ejakulat erscheint [39]. Untersuchungen an Subpopulationen zeigen ferner, daß diese Zellen mehrheitlich durch morphologische Unreife und eine Externalisation von PS gekennzeichnet sind [40].

Caspasen

Obwohl die Inkubation von Hühner-Spermatozoen mit einem Pan-Caspase-Inhibitor das Überleben in Kultur nicht verlängerte [103], gelang der Nachweis der Präsenz und funktionellen Kompetenz von Caspasen in humanen ejakulierten Spermatozoen in fluoreszenzoptischen und proteinbiochemischen Untersuchungen [92]. Später konnte gezeigt werden, daß die Caspasen der wesentlichsten Signalwege (CP-8, -9, -1 und -3) in kompartimentspezifischer Weise aufzufinden sind [51]. CP-8, -1 und -3 finden sich vornehmlich in der postakrosomalen Region, während CP-9 ausschließlich im Mittelstück aufzufinden ist [104, 105]. Das Protein der noch nicht aktivierten pCP-3 wurde zudem als Ziel von Spermatozoen-antikörpern identifiziert [106].

Verlust der Membranasymmetrie und Externalisation von Phosphatidylserin infolge der Aktivierung von Caspasen

Eine erste, äußerlich an einer in Apoptose befindlichen Zelle nachweisbare Veränderung ist die Externalisation von Phosphatidylserin [78, 83]. Die EPS markiert in somatischen Zellen den Beginn der terminalen Apoptose mit vollständig aktivierten Effektorcaspasen. EPS wird jedoch auch bei avitalen Spermatozoen und bei der mittels Bikarbonat induzierten Kapazitation beobachtet [107].

Der Verlust der Asymmetrie der Membran von Spermatozoen mit konsekutiver Annexin-V-Bindung an das EPS wird unabhängig von der Konstellation der klassischen Spermogrammparameter deutlich häufiger bei Zellen von Infertilitätspatienten gefunden [38, 84]. Das Ausmaß der EPS korreliert bei gesunden Spendern mit dem Umfang der Lipidperoxidation [108]. Es besteht zudem eine direkte Korrelation zwischen der Integrität der Zellmembran und dem Ausmaß der Caspaseaktivierung, jedoch mit Unterschieden für die Subtypen [49].

Diese spezifischen Veränderungen an der Membran ermöglichten den Aufbau selektiver Nachweis- und Separationssysteme [84–86, 109, 110]. Die Separationssysteme beruhen auf dem Einsatz von superparamagnetischen Microbeads mit konjugiertem Annexin V (ANMB). Microbeads sind Partikel aus Eisen-II-Oxid, die in einem Dextrangerüst eingebettet sind und zur Verhinderung von Sedimentation und Aggregation in einer stabilen, kolloidalen Lösung vorliegen. Aufgrund ihrer extrem geringen Größe (~50 nm) ist eine mechanische Belastung der Zellen oder eine Störung bei der Flowzytometrie ausgeschlossen. Das System der magnetischen Zellseparation (MACS, magnetic activated cell sorting) wird durch Trennsäulen und einen Magneten vervollständigt. Die Trennsäulen bestehen aus hydrophob und hydrophil beschichteten, miteinander verklebten Eisenkügelchen. Gesinteres Barium-Neodym liefert ein Magnetfeld von 1,5 Tesla in der Säulenmitte, was den in Magnetresonanztomographen verwendeten Magnetfeldstärken entspricht. Ejakulierte EPS⁺-Spermatozoen können somit via Bindung von ANMB immunomagnetisch angereichert oder depletiert werden [111].

Unter Anwendung eines Anti-Annexin-V-Antikörpers wurde flowzytometrisch die Spezifität und Sensitivität des Systems bei 94,8 % bzw. 72,6 % ermittelt. Eine signifikante Beeinflussung von Konzentration, Motilität, Survivalfärbung und Akrosomenreaktion wurde nicht ermittelt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten die Bindung an der Membran [38].

Die mittels MACS angereicherten ANMB⁻-Spermatozoen zeichnen sich durch eine signifikant erniedrigte Frequenz von Zellen mit aktivierten Caspasen im Vergleich zur unseparierten und zur ANMB⁺-Fraktion in Samenproben von gesunden Spendern und von Infertilitätspatienten aus [86]. Die Subpopulation ANMB⁻-Spermatozoen wies bei Spendern $9,2 \pm 1,4$ % vs. $21,8 \pm 2,6$ % und bei Patienten $43,2 \pm 2,1$ % vs. $18,2 \pm 2,6$ % Pan-Caspase⁺-Spermatozoen gegenüber der unfraktionierten Probe ($p < 0,01$) auf. EPS⁺-Spermatozoen zeichnen sich demnach unabhängig von den Variablen des klassischen Spermioграмms auch durch eine deutlich höhere Frequenz von aktivierten Caspasen aus ($r = 0,97$ bei Spendern und $r = 0,72$ bei Patienten; $p < 0,01$) [111]. Die MACS-Separation erwies sich außerdem hinsichtlich der Trennung von Spermatozoen mit Aktivierung von CP-8, -9, -1 und -3 als spezifisch. Der Zusammenhang zwischen Verlust der Membranasymmetrie und der Aktivierung von Caspasen wurde anhand der Berechnung der \log_2OR ermittelt. Er war am stärksten ausgeprägt für die CP-9. Dies ist ein Effekt, der sicherlich durch die räumliche Nähe dicht gepackter Mitochondrien zur Membran hervorgerufen wird. Die Aktivierung von Caspase-3 in nativen Zellen ist durch eine geringe Abhängigkeit von der EPS an der Membran gekennzeichnet [49].

Regulation der Aktivierung von Caspasen

Die wichtigen Regulatoren der Aktivierung von Caspasen Bax, Bak und Bcl-w, nicht jedoch Bcl-2 und Bcl-x, konnten in ejakulierten Spermatozoen im Western Blot nachgewiesen werden [38, 112]. Inwiefern sie tatsächlich regulative Aufgaben in Spermatozoen mit aktivierten Caspasen übernehmen können, ist jedoch unbekannt.

DNA-Fragmentation ejakulierter Spermatozoen

Fragmentierte DNA kann in ejakulierten Spermatozoen mittels TUNEL-Test, Akridinorange-Färbung, dem Komet-Assay und dem Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) nachgewiesen werden [113]. Eine allgemeine Vergleichbarkeit ist jedoch nicht gegeben. Spermatozoen mit stark fragmentierter DNA zeigen mehrheitlich auch eine Aktivierung von CP-8, -9 und -3 [40, 53, 105]. Die Umsetzung des Caspasesignals kann anhand von nachgeschalteten Regulatoren abgeleitet werden. Während PARP mit einer nichtapoptotischen Aufspaltung in 43 % der Zellen zu beobachten ist, sind MDM2 in 74 % der Zellen und p53 in 75–100 % nachweisbar [38, 52]. Das Ausmaß der DNA-Fragmentation (TUNEL) korreliert signifikant mit der Morphologie [114–116], der Konzentration [116, 117] und teilweise der Motilität [116, 118, 119]. Unter Anwendung der TUNEL-Methode wurden apoptotische Spermatozoen zu 0,1 % in Ejakulaten fertiler Probanden, zu 5 % bei Infertilitätspatienten (18 % im Akridinorange-Test), zu 10 % bei Vorhandensein einer Varikozele, zu 20 % infolge eines Kryptorchismus und bis zu 50 % beim Vorliegen eines Seminoms gefunden [114, 120, 121]. Zusätzlich wird die Zahl von Doppelstrangbrüchen vom Alter des Mannes beeinflusst [122].

Kapazitation

Während einer artifiziellen Kapazitation von Spermatozoen finden sich an der Membran Veränderungen, die auch im Rahmen der Apoptose nachweisbar sind. Insbesondere die Lipidredistribution weist Ähnlichkeiten zum PCD auf [62]. Eigene Untersuchungen belegen jedoch die Blockade von CP-1, -9 und -3 nach Induktion mit 30 % BSA unter 5 % CO₂ über 3 Stunden (Publikation in Vorbereitung). Insbesondere CP-1 könnte bei der Vermittlung des physiologischen Membranumbaues und nachfolgender Signaltransduktion durch Cross-talk zum Kalzium-Calpastatin-Calpain-System eine wichtige Rolle zukommen.

Motilität der Spermatozoen

Die Motilität des Spermatozoons ist von den klassischen Spermioграмmvariablen am ehesten geeignet, die Induktion einer Schwangerschaft bzw. eine erfolgreiche assistierte Reproduktion zu prognostizieren. Das intakte mitochondriale Membranpotential korreliert positiv mit der Motilität und der Reife von Spermatozoen [123–125].

Umgekehrt zeichnen sich Spermatozoenfraktionen mit niedriger Motilität durch erhöhte Caspaseaktivität sowohl bei Infertilitätspatienten als auch bei gesunden Spendern aus. Diese Zellen weisen neben dem vermehrten Anteil aktiver CP-3 auch höhere Anteile des Zymogens auf [105]. Innerhalb der Fraktion hochmotiler Spermatozoen finden sich jedoch in der Subpopulation EPS⁺-Zellen auch aktivierte Caspasen [40].

Die Zugabe eines Pan-Caspase-Inhibitors führte jedoch weder zu einer verbesserten Auftaumotilität nach Kryokonservierung noch zu einem verlängerten Überleben von tierischen Spermatozoen [103, 126]. Demzufolge besteht keine ausschließliche Verbindung zwischen CP-abhängiger apoptotischer Signaltransduktion und Überleben der Zelle. Einen Erklärungsansatz liefert die besondere Suszeptibilität der Mitochondrien für zahlreiche Induktoren und Inhibitoren der Apoptose. Betulinsäure (BEA), einer bekannter und potenter Induktor mitochondrialer Apoptose, führt direkt zum Verlust des transmembranösen mitochondrialen Membranpotentials unabhängig vom Einsatz von Caspaseinhibitoren [127]. BEA wird bereits experimentell zur Therapie des malignen Melanoms und von Hirntumoren eingesetzt [128]. Inwiefern solche Therapieformen Auswirkungen auf Spermatozoenfunktionen bzw. die Spermatogenese an sich haben werden, ist unbekannt. Experimentelle Untersuchungen mit BEA an ejakulierten Spermatozoen zeigten jedoch eine konzentrationsabhängige Abnahme der Motilität, den sofortigen Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials $\Delta\psi_m$ sowie die Aktivierung von CP-9 und -3 [50]. Vergleichende Untersuchungen zeigten signifikante Aktivierungen für CP-8, -9 und -3, jedoch keine Beeinflussung von CP-1 (Publikation in Vorbereitung). Im Gegenzug konnte die Motilität und Geschwindigkeit der Spermatozoen durch Bongkregic Acid (BOA), einem potenten Inhibitor der mitochondrialen Apoptose, gegenüber der nichtbehandelten Fraktion innerhalb von 3 Stunden nach Inkubation erhöht werden [50].

Diese vorläufigen Erkenntnisse geben Anlaß, neue und eingeführte Therapien hinsichtlich ihrer molekularen Auswirkungen zu verifizieren. Inwiefern am Mitochondrium ansetzende antiapoptotische Substanzen umfassend protektiv eingesetzt werden können, bleibt abzuwarten.

Relevanz der Aktivierung von Apoptose-signal-kaskaden in ejakulierten Spermatozoen

Die Präsenz und funktionelle Kompetenz verschiedener Caspasesubtypen in ejakulierten Spermatozoen gesunder Spender und in höherem Umfang auch bei Infertilitätspatienten mit unauffälligen klassischen Spermioogrammvariablen sind belegt und somit geeignet, als zusätzliches Qualitätsmerkmal zu fungieren [49, 92]. Eine vom Maturationsgrad abhängige Ausstattung bzw. Inaktivierung von Caspasen und deren Regulatorproteinen spielt dabei wahrscheinlich eine Rolle, woraus sich eine graduell unterschiedliche Suszeptibilität für deren Aktivierung ergibt [40]. Dies unterstreicht die Bedeutung einzusetzender Aufbereitungsverfahren im Rahmen einer künstlichen Befruchtung.

Bis dato ist ungeklärt, in welchem Ausmaß ausgereifte motile Spermatozoen in der Lage sind, infolge innerer oder äußerer Stimuli eine tatsächliche apoptotische Signaltransduktion auszuführen, und in welchem Umfang eine potentielle Aktivierung von Effektorcaspasen zu Schädigungen der DNA führt. Eine vollständige apoptotische Degradation der DNA ist aufgrund der dichten Packung kaum zu erwarten, sodaß im Vergleich zu somatischen Zellen eine unvollständige Umsetzung des PCD plausibel erscheint. Zudem sind ejakulierte Spermatozoen nicht in der Lage, eine Transkription fehlender Zellproteine vorzunehmen [129]. Membran- und DNA-Schäden könnten zudem auch von den durch Caspasen aktivierten Enzymen (Proteinkinase-C) oder dem aus den Mitochondrien freigesetzten AIF vermittelt werden. Denkbar ist auch eine Schädigung benachbarter Zellen durch freigesetzte Caspasen zugrundegehender Spermatozoen und gegebenenfalls die Induktion von Autoantikörpern.

Abzugrenzen hiervon sind Spermatozoen, die im Ejakulat als Fas⁺ charakterisiert werden können und offensichtlich der testikulären Apoptose entkommen sind. Für diese Subpopulation wurde der Begriff der abortiven Apoptose vorgeschlagen [101, 130]. Fas⁺-Spermatozoen finden sich hauptsächlich in der Subpopulation der unreifen, gering motilen und EPS⁺-Zellen, von denen ohnehin kein wesentlicher Beitrag zur natürlichen Befruchtung zu erwarten ist und die sehr leicht mit molekularen Selektionssystemen entfernt werden können [40]. Da eine Positivität für Fas nicht zwangsweise „in Apoptose“ bedeuten muß, bleibt die Klärung der genauen Herkunft und Funktion dieser Rezeptoren in dieser Zellpopulation abzuwarten.

Einfluß von Aufbereitungsmethoden auf die Caspaseaktivität

Moderne Methoden der Spermatozoenaufbereitung wie das Swim-up und die Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) werden umfassend eingesetzt, um mit den so gewonnenen hochmotilen Spermatozoen zielgerichtet hohe Erfolgsraten bei der assistierten Reproduktion erreichen zu können [131]. Andererseits könnte die bei der DGZ erforderliche Beschleunigung die Rate der DNA-Fragmentation erhöhen [132].

Der parallele Nachweis von aktivierter CP-8, -9 und -3, des Zusammenbruchs des transmembranösen, mitochondrialen Potentials $\Delta\psi_m$ und der Frequenz der TUNEL⁺-Spermatozoen zeigte in den mittels DGZ separierten Subpopulationen signifikante Variationen der Aktivie-

rung von Caspasen und des Verlustes des $\Delta\psi_m$, jedoch nicht der DNA-Fragmentation. Mittels MACS konnten diese durch DGZ generierten Subpopulationen noch weiter aufgetrennt werden. Der Prozentsatz von Zellen mit aCP, mit intaktem $\Delta\psi_m$ sowie die Zahl der TUNEL⁺-Spermatozoen variierte zwischen den Subgruppen weiterhin signifikant [40]. Die MACS-Separation ermöglicht somit die Aufreinigung der EPS⁻-Subpopulationen mit geringster Caspaseaktivierung, Disruption des $\Delta\psi_m$ und DNA-Fragmentationen [85, 133, 134]. Die Kombination von DGZ und MACS verbessert die Qualität der aufgereinigten Zellen nochmals [133]. Die Rate der Befruchtungen so selektierter Spermatozoen ist im Hamsterzell-Assay signifikant höher als die unselektierter Zellen (Publikation in Vorbereitung).

Einfluß der Kryokonservierung auf die Aktivierung von Caspasen

Die klassische Kryokonservierung führt mit quantitativen Unterschieden zu einer Erhöhung des Anteils von Fas⁺- und EPS⁺-Zellen [84, 102, 135]. Parallel führt sie zu einer Zunahme der Aktivierung von Caspasen bei Patienten und Probanden [86, 136]. Das Ausmaß der Aktivierung der Caspasesubtypen steht im Verhältnis zur Membranschädigung. Im Rahmen der Kryokonservierung erhöht sich somit die Chance eines Spermatozoons, aCP-8⁺, aCP-9⁺, aCP-1⁺ und aCP-3⁺ zu sein, signifikant gegenüber den für die jeweilige CP negativen Zellen, EPS⁺ zu sein (Rangfolge: aCP-9 > aCP-8 > aCP-3 > aCP-1) [49].

Sowohl die verwendeten Puffersysteme als auch die Abkühlgeschwindigkeiten beeinflussen zusätzlich das Ausmaß der Caspaseaktivierung [38]. Insbesondere Glycerol scheint eine direkte Wirkung auf die Aktivierung von Caspasen und die EPS in höheren Konzentrationen auszuüben [38, 137, 138].

Werden ausschließlich hochmotile/reife Spermatozoen der 90%-Fraktion aus der DGZ kryokonserviert, reduziert sich der Anteil der Zellen mit aktivierter CP-9 nach dem Auftauen signifikant. Eine nachgeschaltete MACS-Extraktion vermindert den Prozentsatz der EPS²/aCP-9⁺-Spermatozoen weiter auf ein Minimum (2,4 %). CP-8 und CP-3 waren im Vergleich zu kryokonservierten Zellen ohne DGZ-Aufbereitung im gleichen Maße in Spermatozoen aktiviert. Die der DGZ nachgeschaltete MACS-Separation ermöglichte jedoch die Elimination dieser Zellen. Hieraus läßt sich schlußfolgern, daß das molekulare Korrelat der hohen Motilität von Spermatozoen aus der 90%-Fraktion der DGZ offensichtlich in einer gering ausgeprägten mitochondrialen Apoptose liegt. Allerdings führt mit Ausnahme der Aktivierung von CP-9 die Kryokonservierung ausschließlich dieser Zellpopulation (DGZ, 90%-Fraktion) nicht zu einer globalen Reduktion apoptotischer Prozesse. Es ist vielmehr sinnvoll, erst nach der Kryokonservierung die nichtapoptotischen Zellen zu extrahieren. Inwiefern in Apoptose befindliche Zellen noch vitale Spermatozoen durch engen Kontakt in Zellsuspensionen schädigen können, muß noch geklärt werden.

Immunologische Infertilität

Antikörper gegen Spermatozoen sind der wichtigste Vermittler der immunologischen Infertilität. Die Inzidenz solcher Antikörper wird mit 9–30 % angegeben [139].

Als Antigen dieser Antikörper wurde u. a. CP-3 in der 2D-Gelelektrophorese identifiziert [106]. Während die Bildung solcher Antikörper durch Zellzerfall nachvollzogen werden kann, bleibt zu klären, an welchen Epitopen diese in intakten Zellen binden.

Schlußfolgerung

Die Erforschung der Apoptose somatischer Zellen hat in der letzten Dekade zu einer rasanten Zunahme des Verständnisses der molekularen Prozesse der Gewebemöostase, des Tumorstadiums und zahlreicher anderer Erkrankungen mit z. B. Neurodegeneration oder viralen Infektionen geführt.

Die Entwicklung einfacher und robuster Testsysteme erleichterte deren Einführung in die Diagnostik der männlichen Infertilität. So ist heute bekannt, daß die Frequenz der DNA-Fragmentation sehr gut zur Prognose der Fertilität herangezogen werden kann. Neueste Untersuchungsergebnisse belegen zudem die Präsenz und funktionelle Kompetenz vieler Signalsysteme in ejakulierten Spermatozoen. Da diese bereits in Zellen nachweisbar sind, die nach den Variablen des klassischen Spermogramms unauffällig erscheinen, könnten sie in der Zukunft als zusätzliche Qualitätsmarker herangezogen werden.

Das neue molekulare Verständnis wird helfen, die Wirkungsmechanismen externer Noxen und die Antwort des Gewebes auf Streß zu verstehen. Diese ersten Erkenntnisse geben Anlaß, eingeführte und experimentelle Therapien, wie z. B. die des Melanoms mit Apoptoseinduktoren sowie die heutigen Aufbereitungsmethoden von Spermatozoen, mit den neuen Untersuchungsmethoden kritisch zu hinterfragen.

Erfahrungen

In den letzten Jahren hat die Intensität der Erforschung des PCD des männlichen Reproduktionssystems stark zugenommen und entsprechende Erfolge verzeichnet. Mit dem derzeitigen Wissen sind kausale Schlüsse jedoch noch nicht möglich.

Hinweise für die Praxis

Die derzeit vorliegenden Ergebnisse zur Aktivierung von Caspasen sind limitiert, sodaß eine breite Anwendung in der andrologischen Praxis noch nicht angezeigt ist. Erste tierexperimentelle Evaluationen zeigen, daß EPS-Spermatozoen in der IVF verbesserte Befruchtungsraten haben.

Literatur:

1. Vogt C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Solothurn, 1842.
2. Helm FE. Über die Spinndrüsen der Lepidopteren. *Z Wiss Zool* 1876; 26: 434–69.
3. Clarke PG, Clarke S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 1996; 193: 81–99.
4. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105: 13–20.
5. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239–57.

6. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251–306.
7. Barnoy S, Kosower NS. Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems. *FEBS Lett* 2003; 546: 213–7.
8. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10964–7.
9. Bratton SB, Cohen GM. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 306–15.
10. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 299–306.
11. 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.
12. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415–30.
13. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 1): 1–16.
14. Yamamoto T, Ruden U, Esposti P, Stigbrand T, Andersson L, Hisazumi H, Wahren B. Profiles of epitope-defined markers in sera from patients with testicular germ cell tumors. *Urol Res* 1988; 16: 31–6.
15. Hengartner MO. Programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Recent Prog Horm Res* 1999; 54: 213–22.
16. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1028–42.
17. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312–6.
18. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 256: 27–33.
19. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17: 1675–87.
20. Marks N, Berg MJ, Guidotti A, Saito M. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 1998; 52: 334–41.
21. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
22. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000; 407: 810–6.
23. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 1999; 276: E310–E316.
24. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998; 254: 439–59.
25. Alimonti JB, Shi L, Baijal PK, Greenberg AH. Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 2001; 276: 6974–82.
26. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169–78.
27. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305–8.
28. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7464–9.
29. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenaabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 356–70.
30. 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.
31. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997; 138: 2081–8.
32. Riccioli A, Salvati L, D'Alessio A, Starace D, Giampietri C, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E. The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role. *Andrologia* 2003; 35: 64–70.
33. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4: 31–7.

34. Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM, Vera Y, Rodriguez S, Yen PH, Soeng K, Wang C, Swerdloff RS. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology* 2003; 144: 3167–75.
35. Richburg JH, Nanez A. Fas- or FasL-deficient mice display an increased sensitivity to nitrobenzene-induced testicular germ cell apoptosis. *Toxicol Lett* 2003; 139: 1–10.
36. 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.
37. Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Ojala M, Pentikainen MO, Parvinen M, Dunkel L. TNFalpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4480–8.
38. Paasch U. Der programmierte Zelltod humaner Spermatozyten – Mechanismen der Signaltransduktion und assoziierte Membranveränderungen im physiologischen und pathologischen Kontext im Hinblick auf eine potentielle diagnostische und therapeutische Konsequenz. [The programmed cell death of human spermatogenesis and ejaculated spermatozoa – mechanisms of signal transduction under physiological and pathological conditions and the consequences for diagnostic and treatment]. Shaker Verlag, Aachen, Germany, 2002.
39. 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.
40. Paasch U, Agarwal A, Gupta AK, Sharma RK, Grunewald S, Thomas AJ Jr, Glander HJ. Apoptosis signal transduction and the maturity status of human spermatozoa. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1010: 486–9.
41. Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ, Agarwal A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril* 2005; 83 (Suppl 1): 1106–12.
42. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619–42.
43. Petit PX, Lecoœur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 1995; 130: 157–67.
44. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479–89.
45. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 2001; 20: 998–1009.
46. Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF, Kawai K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett* 2000; 477: 1–7.
47. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410: 549–54.
48. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309–12.
49. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Transduktion von Apoptosignalen in ejakulierten Spermatozoen nach Kryokonservierung via Aktivierung von Caspasen. *J Fertil Reprod* 2003; 13: 22–31.
50. Dathe S, Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. [Mitochondrial damage in sperm caused by betulinic acid]. *Hautarzt* 2005; 56: 768–72.
51. Paasch U, Grunewald S, Jope T, Fitzl G, Glander HJ. Activation of caspases in ejaculated spermatozoa with disturbed membranes. In: Acosta AA (ed). 12th World Congress on In Vitro Fertilization and Molecular Reproduction, Buenos Aires. Monduzzi Editore, Bologna, 2002; 173–7.
52. Morshedi M, Taylor SL, Weng SL, Duran H, Beebe SJ, Oehninger S. Roles for caspases in human spermatozoa: a marker for sperm quality? *Fertil Steril* 2003; 80: 30–1.
53. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 80: 531–5.
54. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98–103.
55. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, Del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 21836–42.
56. Williams KM, Ford WC. Effects of Ca-ATPase inhibitors on the intracellular calcium activity and motility of human spermatozoa. *Int J Androl* 2003; 26: 366–75.
57. Richburg JH, Nanez A, Williams LR, Embree ME, Boekelheide K. Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. *Endocrinology* 2000; 141: 787–93.
58. Hamer G, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Kal HB, De Rooij DG. Intercellular bridges and apoptosis in clones of male germ cells. *Int J Androl* 2003; 26: 348–53.
59. Shiraishi K, Naito K, Yoshida KI. Vasectomy impairs spermatogenesis through germ cell apoptosis mediated by the p53-bax pathway in rats. *J Urol* 2001; 166: 1565–71.
60. Tang DG, La E, Kern J, Kehrer JP. Fatty acid oxidation and signaling in apoptosis. *Biol Chem* 2002; 383: 425–42.
61. Bidere N, Senik A. Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: a minireview. *Apoptosis* 2001; 6: 371–5.
62. Schiller J, Arnhold J, Glander HJ, Arnold K. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy – effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids* 2000; 106: 145–56.
63. Glander HJ, Schiller J, Stüb R, Paasch U, Grunewald S, Arnhold J. Deterioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lyso-phosphatidylcholines. *Andrologia* 2002; 34: 360–6.
64. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebbersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441–6.
65. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 589–98.
66. Dathe S, Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Betulinic acid gerigerte Disruption des mitochondrialen Membranpotentials in ejakulierten humanen Spermatozoen. *Reproduktionsmedizin* 2003; 19: 234.
67. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491–501.
68. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* 2003; 193: 10–21.
69. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3237–45.
70. 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.
71. Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 552–8.
72. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 1996; 384: 638–41.
73. Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang J, MacPherson DP, Black SC, Hornung F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, Nicholson DW. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 1998; 5: 271–88.
74. De Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 694–701.
75. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 1998; 16: 2265–82.
76. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; 91: 627–37.
77. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300–4.

78. 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.
79. Homburg CH, De Haas M, Dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995; 85: 532–40.
80. Muller K, Pomorski T, Marienfeld K, Herrmann A, Muller P. Transverse mobility of aminophospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Pflugers Arch* 1996; 431: R255–R256.
81. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 1997; 272: 26159–65.
82. Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 2000; 275: 23065–73.
83. 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.
84. 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.
85. Paasch U, Grunewald S, Wuendrich K, Jope T, Glander HJ. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian J Androl* 2005; 7: 61–9.
86. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001; 2: 127–33.
87. Gao CF, Ren S, Zhang L, Nakajima T, Ichinose S, Hara T, Koike K, Tsuchida N. Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2001; 265: 145–51.
88. Socher SA, Yin Y, DeWolf WC, Morgentaler A. Temperature-mediated germ cell loss in the testis is associated with altered expression of the cell-cycle regulator p53. *J Urol* 1997; 157: 1986–9.
89. 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.
90. Solary E, Eymin B, Droin N, Haugg M. Proteases, proteolysis, and apoptosis. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14: 121–32.
91. Tanaka H, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Kamidono S. Apoptosis-related proteins in the testes of infertile men with varicocele. *Br J Urol Int* 2002; 89: 905–9.
92. Paasch U, Grunewald S, Wuendrich K, Glander HJ. Caspases are associated with apoptosis in human ejaculated spermatozoa and in spermatogenesis. In: Robaire B, Chemes H, Morales CR (eds). *Andrology in the 21st Century*. Medimond, New York, 2001; 59–64.
93. Yap DB, Hsieh JK, Lu X. Mdm2 inhibits the apoptotic function of p53 mainly by targeting it for degradation. *J Biol Chem* 2000; 275: 37296–302.
94. Erhardt P, Tomaselli KJ, Cooper GM. Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 1997; 272: 15049–52.
95. Guillou L, Estreicher A, Chaubert P, Hurlimann J, Kurt AM, Metzger G, Iggo R, Gray AC, Jichlinski P, Leisinger HJ, Benhattar J. Germ cell tumors of the testis overexpress wild-type p53. *Am J Pathol* 1996; 149: 1221–8.
96. Sorger C, Paasch U, Grunewald S, Horn LC, Glander HJ. Die Präsenz von BAD, nicht aber von BID und MDM2 ist in klassischen Seminomen variabel. *Reproduktionsmedizin* 2003; 19: 243–4.
97. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribose)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 1999; 342 (Pt 2): 249–68.
98. Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Sawamoto K, Okano H, Miwa M, Uchida K. Genetic and functional analysis of PARP, a DNA strand break-binding enzyme. *Mutat Res* 2001; 477: 89–96.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Characterization and depletion of membrane deteriorated human spermatozoa. In: Phillips GO, Von Versen R (eds). *Advances in Tissue Banking*. World Scientific, Singapore, New Jersey, London, HongKong, 2003; 14–25.
103. Weil M, Jacobson MD, Raff MC. Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J Cell Sci* 1998; 111: 2707–15.
104. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glander HJ. The activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004; 81: 802–9.
105. Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 984–91.
106. Bohring C, Krause E, Habermann B, Krause W. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by anti-sperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 113–8.
107. De Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 2003; 68: 2122–34.
108. Schuffner A, Morshedi M, Oehninger S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. *Hum Reprod* 2001; 16: 2148–53.
109. Von Schonfeldt V, Krishnamurthy H, Foppiani L, Schlatt S. Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from Djungarian hamster, mouse, and marmoset monkey testes. *Biol Reprod* 1999; 61: 582–9.
110. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Immunomagnetic preparation of non-apoptotic human sperms. *Andrologia* 2001; 33: 176–7.
111. 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.
112. Blanc-Layrac G, Bringuier AF, Guillot R, Feldmann G. Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000; 46: 187–97.
113. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131–3.
114. Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1950–3.
115. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filiberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000; 21: 903–12.
116. 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.
117. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33–44.
118. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 1338–44.
119. Giwercman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, Spano M. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril* 2003; 80: 1404–12.
120. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28: 587–96.
121. Haustein B, Glander HJ. Die Routine-Spermiogramm-Variablen korrelieren nicht mit der Spermien-Chromatin-Integrität. *Z Hautkr* 1999; 9: 471–5.
122. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effect of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80: 1420–30.
123. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondria

- drial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 279–80.
124. Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Franceschi C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res* 1998; 241: 384–93.
 125. Windsor DP, White IG. Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sperm rhodamine 123 accumulation. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 354–60.
 126. Peter AT, Linde-Forsberg C. Efficacy of the anticaspase agent zVAD-fmk on post-thaw viability of canine spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 59: 1525–32.
 127. Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, Krammer PH, Kroemer G, Peter ME, Debatin KM. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem* 1998; 273: 33942–8.
 128. Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, Brown DM et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* 1995; 1: 1046–51.
 129. Grunewald S, Paasch U, Anderegg U, Glander HJ. Mature spermatozoa do not synthesize novel RNA. *Andrologia* 2005; 37: 69–71.
 130. 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.
 131. Zollner U, Martin S, Liebermann J, Steck T. Evaluation of a cut-off value for sperm motility after different hours of incubation to select the suitable reproductive technology (IVF or ICSI). *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78: 326–31.
 132. Zini A, Nam RK, Mak V, Phang D, Jarvi K. Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing. *Fertil Steril* 2000; 74: 824–7.
 133. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Liang L, Agarwal A. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation technique. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 740–6.
 134. Said TM, Grunewald S, Rasch M, Paasch U, Agarwal A, Glander HJ. Enhancement of sperm motility and cryosurvival rates by magnetic-activated cell sorting. *Fertil Steril* 2005; 83: 1442–6.
 135. Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000; 74: 245–50.
 136. Grunewald S, Paasch U, Wuendrich K, Glander HJ. Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryostorage. *Arch Androl* 2005; in press.
 137. Wuendrich K, Paasch U, Leicht M, Glander HJ. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation – an immunoblot study. *Cell Tissue Bank* 2005; in press.
 138. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl* 2001; 22: 646–51.
 139. Collins JA, Burrows EA, Yeo J, Younglai EV. Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. *Hum Reprod* 1993; 8: 592–8.

Mitteilungen aus der Redaktion

Die meistgelesenen Artikel



Speculum

Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

