

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein  
des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

## **Effekte von Mastzellproteasen auf die Motilität humaner Spermatozoen**

**Martin Benjamin Sbornik**

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein  
des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

## **Effekte von Mastzellproteasen auf die Motilität humaner Spermatozoen**

**Martin Benjamin Sbornik**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. F.-M. Köhn

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring

Die Dissertation wurde am 10.01.2005 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

**Für meine Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>4</b>  |
| <hr/>     |   |           |
| 1.1.      | <b>Die Mastzelle</b>  | <b>4</b>  |
| 1.1.1.    | Identifikation und Lokalisation   | 4         |
| 1.1.2.    | Funktion  | 5         |
| 1.2.      | <b>Mastzellproteasen</b>  | <b>5</b>  |
| 1.2.1.    | Funktion der Mastzellproteasen  | 6         |
| 1.2.2.    | Mastzellproteasen als klinischer Indikator für Mastzellaktivität  | 8         |
| 1.3.      | <b>Proteinase-activated receptors (PAR)</b>   | <b>9</b>  |
| 1.4.      | <b>Interaktionen zwischen Tryptase und des PAR-2-Rezeptors bei fibrotischen Erkrankungen des Menschen</b> | <b>9</b>  |
| 1.5.      | <b>Bedeutung von Mastzellen und ihrer Produkte im menschlichen Hoden</b>                                  | <b>10</b> |
| 1.6.      | <b>Fragestellung und Arbeitsprogramm</b>  | <b>12</b> |
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>14</b> |
| <hr/>     |   |           |
| 2.1.      | <b>Materialien</b>  | <b>14</b> |
| 2.1.1.    | Geräte  | 14        |
| 2.1.2.    | Chemikalien   | 14        |
| 2.2.      | <b>Patienten und Probanden</b>  | <b>15</b> |
| 2.3.      | <b>Lokalisation von Mastzellen im menschlichen Eileiter</b>   | <b>17</b> |
| 2.4.      | <b>Lokalisation von PAR-2-Rezeptoren auf Spermatozoen</b>   | <b>17</b> |
| 2.5.      | <b>Messung von Tryptase im menschlichen Seminalplasma und in menschlicher Follikelflüssigkeit</b>         | <b>18</b> |
| 2.6.      | <b>Effekte von Tryptase auf Spermatozoen</b>  | <b>19</b> |
| 2.7.      | <b>Reversibilität des Tryptase-Effekts auf Spermatozoen</b>   | <b>19</b> |
| 2.8.      | <b>Effekte von Chymase auf menschliche Spermatozoen</b>   | <b>19</b> |
| 2.9.      | <b>Reversibilität des Chymase-Effekts auf Spermatozoen</b>  | <b>20</b> |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>2.10.</b> | <b>Hemmung des Tryptase-Effekts auf Spermatozoen mit monoklonalen Anti-Tryptase-Antikörpern der Maus</b>                     | <b>20</b> |
| <b>2.11.</b> | <b>Effekte des polyklonalen PAR-2-Antikörpers (proteinase-activated receptors 2 c17: sc 8205) der Ziege auf Spermatozoen</b> | <b>21</b> |
| <b>2.12.</b> | <b>Statistische Analyse</b>  | <b>21</b> |
| <b>3.</b>    | <b>Ergebnisse</b>  | <b>22</b> |
| <b>3.1.</b>  | <b>Tryptase im menschlichen Seminalplasma und menschlicher Follikelflüssigkeit</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.2.</b>  | <b>Immunhistochemische Bestimmung der Lokalisation von Mastzellen im menschlichen Eileiter</b>                               | <b>23</b> |
| <b>3.3.</b>  | <b>Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von PAR-2-Rezeptoren auf humanen Spermatozoen</b>                                 | <b>24</b> |
| <b>3.4.</b>  | <b>Effekte von Tryptase auf die menschliche Spermatozoenmotilität</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.5.</b>  | <b>Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Tryptase-Effekts auf die Spermatozoenmotilität</b>                               | <b>27</b> |
| <b>3.6.</b>  | <b>Effekte von Chymase auf die menschliche Spermatozoenmotilität</b>   | <b>28</b> |
| <b>3.7.</b>  | <b>Reversibilität des Effekts von Tryptase auf menschliche Spermatozoen</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.8.</b>  | <b>Irreversibilität des Effekts von Chymase auf die Motilität menschlicher Spermatozoen</b>                                  | <b>30</b> |
| <b>3.9.</b>  | <b>Inhibition der Tryptasewirkung auf die Spermatozoenmotilität durch Anti-Tryptase-Antikörper</b>                           | <b>31</b> |
| <b>3.10.</b> | <b>Verhinderung der Tryptaseeffekte auf die Spermatozoenmotilität durch Vorinkubation mit PAR-2-Rezeptor-Antikörpern</b>     | <b>32</b> |
| <b>4.</b>    | <b>Diskussion</b>  | <b>33</b> |
| <b>5.</b>    | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>41</b> |

|           |                             |           |
|-----------|-----------------------------|-----------|
| <b>6.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b> | <b>43</b> |
| <b>7.</b> | <b>Danksagung</b>           | <b>50</b> |
| <b>8.</b> | <b>Lebenslauf</b>           | <b>51</b> |

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Mastzelle

#### 1.1.1. Identifikation und Lokalisation

Mastzellen sind wichtige Effektorzellen allergischer Reaktionen. Außerdem nehmen sie eine bedeutende Rolle im Rahmen fibrotischer und chronisch-entzündlicher Prozesse ein. In den letzten Jahren mehrten sich die Hinweise auf eine Beteiligung von Mastzellen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (55).

Mastzellen (Abb. 1) kommen in beinahe allen Organen des menschlichen Körpers vor (55, 30), vor allem im Bindegewebe von Haut, Lunge, Verdauungstrakt und auch in den Geschlechtsorganen des Mannes (z.B. im interstitiellen Bindegewebe des Hodens, in der Lamina propria der Tubuli seminiferi und im Nebenhoden) und der Frau (3, 34, 28).

Die Mastzelle wurde vor über 100 Jahren von Paul Ehrlich entdeckt (15). Er beschrieb sie als Zellen, welche zytoplasmatische Granula enthielten und die sich mit Anilinblau rot bzw. blau anfärben ließen (15, 16). Darüber hinaus beschrieb Ehrlich erstmals die Assoziation von Mastzellen mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Neoplasien (15).

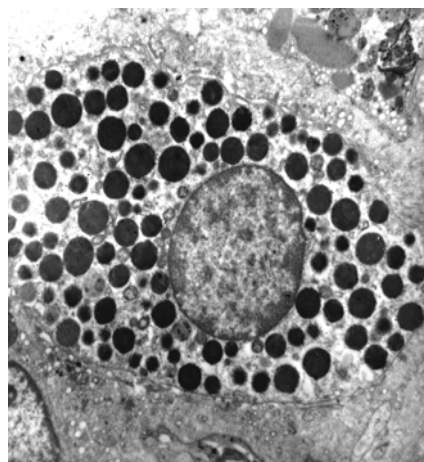


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mastzelle (29).

### 1.1.2. Funktion

Obwohl ihre genaue pathophysiologische Bedeutung noch nicht exakt eruiert werden konnte, ist bekannt, dass Mastzellen eine entscheidende Rollen bei entzündlichen, allergischen und fibrotischen Erkrankungen spielen (60, 55). Mastzellen entfalten diese Wirkung über biogene Amine (Histamin, Serotonin), Proteoglykane (Heparin, Chondroitinsulfate), Prostaglandine und besonders über Proteasen (Tryptase, Chymase, Cathepsin-G-like Protease, Carboxypeptidase) (60, 55, 43).

Darüber hinaus exprimieren und sezernieren Mastzellen eine Reihe von Rezeptoren und Zytokinen, darunter tumor-necrosis factor- $\alpha$ , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, transforming growth factor- $\beta$ , Interferon- $\gamma$  und verschiedene Interleukine, u.a. IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13 (22, 8, 2). IL-4, IL-5, IL-9 spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Asthma. Darüber hinaus ist bekannt, dass IL-5 essentiell für die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten ist. Ebenso spielen IL-9 und IL-13 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Entzündungen im Respirationstrakt (39, 52, 57).

### 1.2. Mastzellproteasen

Beim Menschen unterscheidet man aufgrund ihres unterschiedlichen Gehalts an neutralen Proteasen immunhistochemisch zwei Arten von Mastzellen (43, 55).

Der **MC<sub>TC</sub>-Typ** beinhaltet Tryptase (ca. 35 pg / Zelle), Chymase (ca. 4,5 pg / Zelle), Cathepsin-G-like Protease, Mastzell-Carboxypeptidase (ca. 10 pg / Zelle) und Histamin (ca. 1,9 pg / Zelle) (Tab. 1). Er ist in der intestinalen **Mucosa** und **Submucosa** anzutreffen und ist der dominierende Typ in axillären Lymphknoten, der Conjunctiva und dem Parenchym der Mamma (43, 55).

Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase sind zusammen in einem sekretorischen Granulum lokalisiert. Sie sind an makromolekulare Proteoglykankomplexe gebunden, wobei Chymase und Carboxypeptidase einen gemeinsamen Komplex bilden. Tryptase ist separat an einen eigenen Proteoglykankomplex gebunden (43).

Der **MC<sub>T</sub>-Typ** enthält Tryptase (ca. 10 pg / Zelle), Heparin, Histamin (1,5 pg / Zelle) und Chondroitinsulfat A und E. Diese Mastzellunterform hat ihre Lokalisation in der



intestinalen **Mucosa**, jedoch **nicht** in der Submucosa. Der MC<sub>TC</sub>-Typ dominiert im gesamten Lungengewebe. MC<sub>TC</sub>-Zellen und MC<sub>T</sub>-Zellen sind in der Mukosa der Nasenschleimhaut in einem Verhältnis von ca. 2:1 anzutreffen (Tab. 1) (43, 55).

Sowohl MC<sub>TC</sub>-Zellen als auch MC<sub>T</sub>-Zellen produzieren Interleukine. IL-4 wird zu 85% überwiegend von MC<sub>TC</sub>-Zellen produziert. IL-5 und IL-6 werden hingegen fast ausschließlich von MC<sub>T</sub>-Zellen synthetisiert (55).

**Tabelle 1: Mastzellen und ihre Inhalte (55)**

| Charakteristika      | MC <sub>T</sub> -Zellen<br>(pg / Zelle) | MC <sub>TC</sub> -Zellen<br>(pg / Zelle)                               |
|----------------------|---|--|
| <b>Proteinasen</b>   | Tryptase (10)                           | Tryptase (35)<br>Chymase (4,5)<br>Carboxypeptidase (19)<br>Cathepsin G |
| <b>Amine</b>         | Histamin (1,5)                          | Histamin (1,9)   |
| <b>Proteoglykane</b> | Heparin<br>Chondroitinsulfat A, E       | Heparin<br>Chondroitinsulfat A,E                                       |
| <b>Zytokine</b>      | IL-4, IL-5, IL-6                        | IL-4, IL-8   |

### 1.2.1. Funktion der Mastzellproteasen

**Chymase** ist eine Serin-Endoprotease, die auf Chymotrypsin-ähnliche Substrate, u. a. VIP (vasoaktives intestinales Polypeptid), Bradykinin, Kallikrein, und Substanz P spezialisiert ist. Während bei Säugetieren zahlreiche Unterformen existieren, die sich bezüglich ihrer Ladung, Löslichkeit, Proteoglykan-Bindungsfähigkeit, Glykolysierung und katalytischen Fähigkeiten unterscheiden, scheint beim Menschen jedoch, basierend auf derzeitigen genetischen und enzymatischen Untersuchungen, nur eine Hauptform der Chymase zu existieren (55).

Funktionell inaktiviert **Chymase** Bradykinin und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von Bronchokonstriktoren (55). Es konnte gezeigt werden, dass

Inkubation von menschlicher Haut mit Chymase zu einem Verlust der Adhäsionsfilamente zwischen Basalmembran und dermo-epidermaler Junctionszone führt (1, 10). Weiterhin wird vermutet, dass Chymase modulierend bei entzündlichen Ereignissen der Haut eingreift, da sie die Dauer von Vasodilatationen, ausgelöst durch die Reizung sensorischer Nerven, verlängern kann (9).

Ein weiteres wichtiges biologisches Substrat der Chymase ist Angiotensin I; Chymase besitzt die Fähigkeit, Angiotensin I zu Angiotensin II unabhängig vom Angiotensin – Converting – Enzym (ACE) zu konvertieren (49).

**Tryptase** ist der Hauptbestandteil menschlicher Mastzellen (19). Man differenziert Tryptase in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tryptase, wobei bei der  $\alpha$ -Tryptase zwei Hauptformen ( $\alpha$  I und  $\alpha$  II), und der  $\beta$ -Tryptase drei Hauptformen ( $\beta$  I,  $\beta$  II, und  $\beta$  III) differenziert werden (31, 46).

Die  $\alpha$ -Tryptase ist hierbei die aktive, homotetramere Form, welche nicht in sekretorischen Granula gespeichert ist.  $\alpha$ -Tryptase wird von Mastzellen direkt freigesetzt. Dies wurde bewiesen, da sowohl der Vorläufer von  $\alpha$ -Tryptase als auch  $\alpha$ -Tryptase selbst im Vergleich zur monomeren  $\beta$ -Protryptase Aminosäuresequenzen aufweisen, die nicht durch intramolekulare Autoproteolyse verändert werden (40).

Die  $\beta$ -Tryptase ist die monomere, inaktive Form der Tryptase. Um diese in die tetramere  $\alpha$ -Tryptase zu verwandeln, sind sowohl ein saurer pH-Wert als auch die Anwesenheit von Heparin notwendig. Dissoziiert Tryptase von seiner Heparinbindung ab, verändert sie ihre Form. Dies konnte mittels Antikörpern, welche aktive Tryptase erkennen können und durch Messung der katalytischen Aktivitäten der Tryptase-formen nachgewiesen werden (44).

Funktionell aktiviert Tryptase Prostomyelin (Metalloproteinase III) und inaktiviert Fibrinogen (43). Erst kürzlich wurde entdeckt, dass humane Tryptase eine Abnahme des Calcitonin-Related Proteins bewirkt, so dass Calcitonin als potenter Vasodilatator unter Tryptaseeinfluss an Aktivität verliert (54). Untersuchungen an isolierten Hundebronchi konnten zeigen, dass Tryptaseeinfluss zu einer erhöhten Kontraktilität der glatten Bronchialmuskulatur, bedingt durch einen erhöhten Ca – Einstrom in die Muskelzellen, führt (48).

In der Epidermis werden mittels Tryptase Fibronectin und Kollagenase Typ IV abgebaut. Dies könnte eine Rolle beim Gewebeumbau und Matrixabbau spielen, da Fibronectin als extrazelluläres Matrixprotein unter Tryptaseeinfluss dosisabhängig vermindert wird (27).

Im Rahmen der Blutgerinnung nimmt Tryptase Einfluss auf den Fibrinogenabbau und -inaktivierung (45).

Außerdem bewirkt Tryptase eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße und verstärkt die Leukozyteneinsprossung über eine Hemmung der Thrombinwirkung an der glatten Gefäßmuskulatur (17).

### **1.2.2. Mastzellproteasen als klinischer Indikator für Mastzellaktivität**

In den letzten Jahren hat Tryptase als klinischer Marker für Mastzellaktivität oder sogar für die Mastzelllast eines Menschen immer mehr an Bedeutung gewonnen (37).

Bei Patienten mit Mastozytose oder im Rahmen anaphylaktischer Reaktionen können erhöhte Tryptasewerte im Serum gemessen werden (43). Während einer anaphylaktischen Reaktion erreicht die Tryptasekonzentration ihr Maximum nach 60 bis 120 Minuten, um danach mit einer Halbwertszeit von zwei Stunden wieder abzufallen (47).

Darüber hinaus konnten erhöhte Tryptasekonzentrationen post mortem in Seren von Kindern festgestellt werden, die am sudden-infant-death-syndrom verstarben, so dass eine Ursache dieses multifaktoriellen Krankheitsbildes anaphylaktische Reaktionen sein können (38).

Ein Charakteristikum von Asthma als chronisch-entzündliche Erkrankung ist eine gesteigerte Mastzellaktivität. Es konnte gezeigt werden, dass Asthmapatienten erhöhte Tryptase- und PGD<sub>2</sub>-Konzentrationen im Bronchiallavat aufweisen.

Zudem zeigen Mastzellen aus bronchioalveolärer Lavage von Asthmapatienten einen gesteigerten Spontanrelease von Histamin (48).

### **1.3. Proteinase-activated receptors (PAR)**

Zur Gruppe der PAR-Rezeptoren gehören vier G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren, welche normalerweise proteolytisch über einen an ihnen gebundenen Liganden aktiviert werden. Drei der Rezeptoren (PAR 1, 3, 4) werden mittels Thrombin über proteolytische Spaltung ihrer Aminotermini aktiviert. Der PAR-2-Rezeptor kann jedoch auch von anderen Proteasen aktiviert werden, u.a. Trypsin, Tryptase und Faktor Xa (37).

Die Verteilung des PAR-2 Rezeptors im Gewebe und seine Funktion sind noch nicht völlig geklärt. Northern-Blot-Analysen konnten PAR-2 mRNA in der Niere, im Magen, im Pankreas, in der Leber, im Colon und im Dünndarm nachweisen (14, 7, 35). Weiterhin ist bekannt, dass dieser Rezeptor an der Oberfläche von Keratinozyten, Fibroblasten, Enterozyten, Endothelialzellen, glatten Muskelzellen, T-Zellen und bestimmten Tumorzellen exprimiert wird (36, 13).

Untersuchungen bewiesen, dass die Serinprotease Tryptase, ebenfalls wie Trypsin, die Fähigkeit besitzt, den PAR-2 Rezeptor zu aktivieren. Eine Deaktivierung über Gabe von PAR-2-Rezeptor-Antikörpern bzw. Tryptase-Antikörpern konnte ebenso aufgezeigt werden (33).

### **1.4. Interaktionen zwischen Tryptase und des PAR-2-Rezeptors bei fibrotischen Erkrankungen des Menschen**

Mastzellen können fibroproliferative Aktionen in menschlichen Fibroblasten auslösen (18). Im Rahmen von Co-Kultivierung von humanen Mastzellen mit Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass diese vor allem über eine Hochregulation von Cyclooxygenase 2 (COX 2) und Prostaglandin E<sub>2</sub> in Fibroblasten erreicht wird (18). Als verantwortlich für diesen Effekt werden IL-4, IL-1 $\beta$  oder die secretory phospholipase A diskutiert (18, 25, 51).

Mayerhofer et al. (18) konnten zeigen, dass auch Tryptase die Proliferation von Fibroblasten induziert, indem sie, PAR-2-Rezeptor-vermittelt, einen Anstieg von Cyclooxygenase 2 bewirkt.

### 1.5. Bedeutung von Mastzellen und ihrer Produkte im menschlichen Hoden

Mastzellen sind Bestandteile des Bindegewebes im menschlichen Hoden und des Nebenhodens und liegen hier von der Geburt bis zum Erwachsenenalter vor (34). Sie ähneln ultrastrukturell denen in anderen Bindegeweben. Die Anzahl der Mastzellen sowohl im Interstitium, in der Tunica albuginea als auch im Bindegewebe des Nebenhodens steigt im Säuglingsalter leicht an, nimmt dann im Laufe der Kindheit ab, und erhöht sich dann in der Pubertät erneut. Im Erwachsenenalter ist eine kontinuierliche Abnahme der Anzahl der Mastzellen im testikulären und epididymalen Bindegewebe zu beobachten (34).

Maseki et al. (28) untersuchten Hodenbiopsien von 15 fertilen Patienten und von 70 Patienten mit nicht näher charakterisierter idiopathischer Infertilität. Im Vergleich zu den gesunden Probanden zeigte sich bei den erkrankten Patienten eine erhöhte Anzahl von Mastzellen im interstitiellen Bindegewebe der Tubuli seminiferi.

Yamanaka et al. (59) untersuchten Hodenbiopsieproben von 12 Patienten mit obstruktiver Azoospermie (acht aufgrund kongenitaler bilateraler Aplasie des Vas deferens, vier aufgrund Z.n. inguinaler Herniorrhaphie), von sieben Patienten mit idiopathischer Azoospermie aufgrund Sertoli-Cell-Only-Syndrom oder Spermatogenese-Arrest, von 30 Patienten mit Varikozele und Oligozoospermie, und von acht gesunden, fertilen Männern. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung von Mastzellen ( $p < 0,05$ ) im Bindegewebe und der Lamina propria der Tubuli seminiferi bei Patienten mit Azoospermie, Varikozele oder obstruktiver Azoospermie im Vergleich zu fertilen Patienten. Darüber hinaus zeigte sich, dass bei den gesunden Patienten der MC<sub>T</sub>-Typ dominiert, wohingegen bei allen erkrankten Patientengruppen der MC<sub>TC</sub>-Typ vorrangig ist.

Bei Patienten mit gestörter Spermatogenese findet man eine fibrotische Verdickung der Wände der Tubuli seminiferi. Untersuchungen zeigten, dass infertile Patienten mit ausgeprägter Hypospermatogenese aufgrund eines Spermatogenese-Arrestes ( $n = 6$ ) oder eines Sertoli-Cell-Only-Syndroms ( $n = 6$ ) eine statistisch signifikante Erhöhung von Mastzellen in ihren Tubuli seminiferi im Vergleich zu gesunden

Patienten aufwiesen ( $n = 6$ ) bei ausgeprägter fibrotischer Verdickung der Tubuluswände (29).

Die Beobachtung einer erhöhten Mastzellkonzentration in Hoden infertiler Männer (Abb. 2) und die bekannte fibroproliferative Eigenschaft der Mastzellprotease Tryptase lassen eine wichtige Rolle von Mastzellen in der Pathogenese von Fertilitätsstörungen vermuten (29).

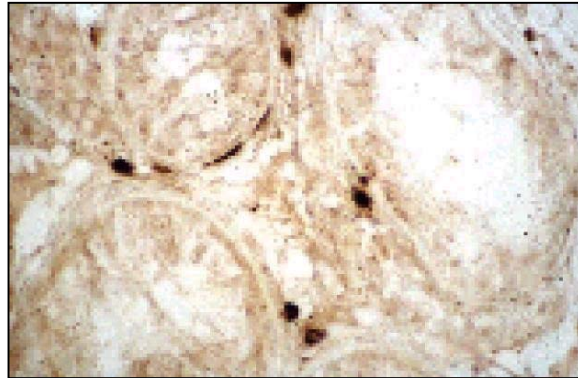


Abb. 2: Tryptase-positive Mastzellen im menschlichen Hoden (29).

Ein weiterer Hinweis dafür, dass Mastzellen und ihre Produkte eine wichtige Rolle im Rahmen der männlichen Infertilität spielen, liefern Berichte über eine verbesserte Ejakulatqualität nach einem Einsatz von Mastzellblockern.

So zeigte der Einsatz des Mastzellblockers Ketotifen in der Behandlung von Oligo- und Asthenozoospermien eine statistisch signifikante Verbesserung der Spermatozoenkonzentration und -motilität. Hierbei wurden Patienten ( $n = 17$ ) mit einer idiopathischen normogonadotropen Oligozoospermie (Spermatozoenkonzentration  $< 20 \times 10^6/\text{ml}$ ) über 3 Monate mit Ketotifen  $2 \times 1 \text{ mg/die}$  behandelt (42).

Eine von Yamamoto et al. (58) durchgeführte, placebo-kontrollierte, randomisierte Studie zum Einsatz des Mastzellblockers Rizaben ( $300 \text{ mg/die}$  über 12 Wochen) bei Männern ( $n = 50$ ) mit idiopathischer Infertilität (Spermatozoenkonzentration  $< 5 \times 10^6/\text{ml}$ ; normale Spermatozoenmorphologie  $> 60\%$ ; Spermatozoenmotilität  $> 10\%$ ) zeigte in der Verumgruppe eine signifikante Erhöhung der Spermatozoenkonzentration, Spermatozoenmotilität und der Anzahl der motilen Spermatozoen. Im

Vergleich zur Schwangerschaftsrate (PR) der Placebogruppe (PR = 0%) betrug diese in der Verumgruppe 28,6%.

Die Gabe des Mastzellblockers Tranilast (n = 17; Spermatozoenkonzentration < 10 x 10<sup>6</sup>/ml; 300 mg/die Tranilast über mind. 12 Wochen) führte in einer von Hibi et al. (23) durchgeführten Studie zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtspermatozoenzahl.

Cayan et al. (11) führten eine Studie mit 16 Patienten durch, die an einer Azoo- bzw. Oligozoospermie litten und eine erhöhte Konzentration tryptasehaltiger Mastzellen ihrer Tubuli seminiferi aufwiesen. Nach einer vier- bis neunmonatigen Behandlung mit dem Mastzellblocker Fexofenadin (180 mg/die) zeigten sich keinerlei Effekte auf die Spermatozoenqualität, und es wurde von keinen Schwangerschaften nach der Behandlung berichtet.

Obwohl einschränkend gesagt werden muss, dass die hierzu durchgeführten Studien methodische Mängel aufwiesen und mit Vorsicht interpretiert werden müssen, war es von herausragendem Interesse, ob, und wenn ja, wie Mastzellprodukte direkte Effekte auf die Motilität humaner Spermatozoen ausüben.

## **1.6. Fragestellung und Arbeitsprogramm**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche direkte Effekte von Mastzellproteasen, vor allem Tryptase und Chymase, auf humane Spermatozoen zu untersuchen. In einzelnen Studien waren Verbesserungen der Ejakulatqualität durch den Einsatz von Mastzellblockern berichtet worden (42, 58, 23). Darüber hinaus ist bekannt, dass Patienten, die an einer idiopathischen Infertilität leiden, eine erhöhte Konzentration von Mastzellen im interstitiellen Bindegewebe ihrer Hoden und in der Lamina propria ihrer Tubuli seminiferi aufweisen (28, 19).

Um mögliche direkte Interaktionen zwischen Mastzellprodukten und Spermatozoen zu untersuchen, sollten zunächst Spermatozoen mit Tryptase bzw. Chymase verschiedener Konzentrationen inkubiert und ihre Motilität zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem CASA-System (computer-assisted semen analysis) bestimmt werden. Nach Etablierung motilitätshemmender Einflüsse von Tryptase sollten deren

Mechanismen weiter untersucht werden. Da bekannt ist, dass Tryptase fibroproliferative Effekte über PAR-2-Rezeptoren ausübt (18), sollte eine mögliche Rolle dieser Rezeptoren bei der Vermittlung der Tryptaseeffekte auf Spermatozoen untersucht werden. Außerdem galt es herauszufinden, ob und in welchem Umfang Spermatozoen in vivo mit Tryptase in Kontakt kommen können. Hierzu sollten immunhistochemische Untersuchungen an Eileitergewebe sowie Untersuchungen zum Nachweis von Tryptase in Seminalplasma und Follikelflüssigkeit durchgeführt werden.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Materialien**

#### **2.1.1. Geräte**

Mika Motion Analyzer für Windows V1.0, copyright by mika medical GmbH

Mikroskop: Nikon Type 104, Fa. Nikon, Japan

Zentrifuge: Hettrich Universal 32, Fa. Carl Zeiss, Göttingen

Reaktionsgefäße: Eppendorf tubes 1,5 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg

Pipetten: 5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 500 µl, Fa. Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen: 5 µl, 200 µl, 500 µl, Fa. Eppendorf, Hamburg

#### **2.1.2. Chemikalien**

PBS-Puffer (phosphate buffered saline), Fa. Life Technologies, Paisley, Schottland

Human Recombinant Skin  $\beta$  Tryptase, Fa. Promega, Madison, USA

MES (2-N-Morpholino-ethanesulfonic acid), Hausapotheke des Klinikums rechts der Isar, München

MOPS (3-N-morpholino-2-hydroxypropanesulfonicacid), Hausapotheke des Klinikums rechts der Isar, München

Glycerol 10%, Hausapotheke der Klinikums rechts der Isar, München

NaCl 200 mM, Hausapotheke des Klinikums rechts der Isar, München

Heparin 0,5 mg/ml, Fa. Merck KG, Darmstadt

Mouse-anti-tryptase-IgG monoclonal antibodies, Fa. Pharmacia & Upjohn, Dübendorf

Goat-anti-PAR2 polyclonal antibodies, Fa. Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA

Human recombinant chymase, erhalten von Norman Schechter, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

Medicult sperm preparation medium, Fa. Medicult, Jyllinge, Dänemark

## **2.2. Patienten und Probanden**

Die in den Experimenten verwendeten Ejakulate stammten von gesunden Probanden (n = 12) in einem Alter von 23-42 Jahren, die keinerlei Anamnese bezüglich Infertilitätsstörungen aufwiesen und vorher ihr Einverständnis gegeben hatten.

Das frische, nach ca. 20 Minuten verflüssigte Ejakulat wurde 10 Minuten bei 1760 U/min zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 4 ml Medicult Spermatozoenpräparationsmedium resuspendiert. Anschließend wurde erneut bei 1760 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wiederum mit 4 ml Medium resuspendiert.

Die Ejakulate wurden nach Standardparametern gemäss den Vorgaben der World Health Organization (56) analysiert.

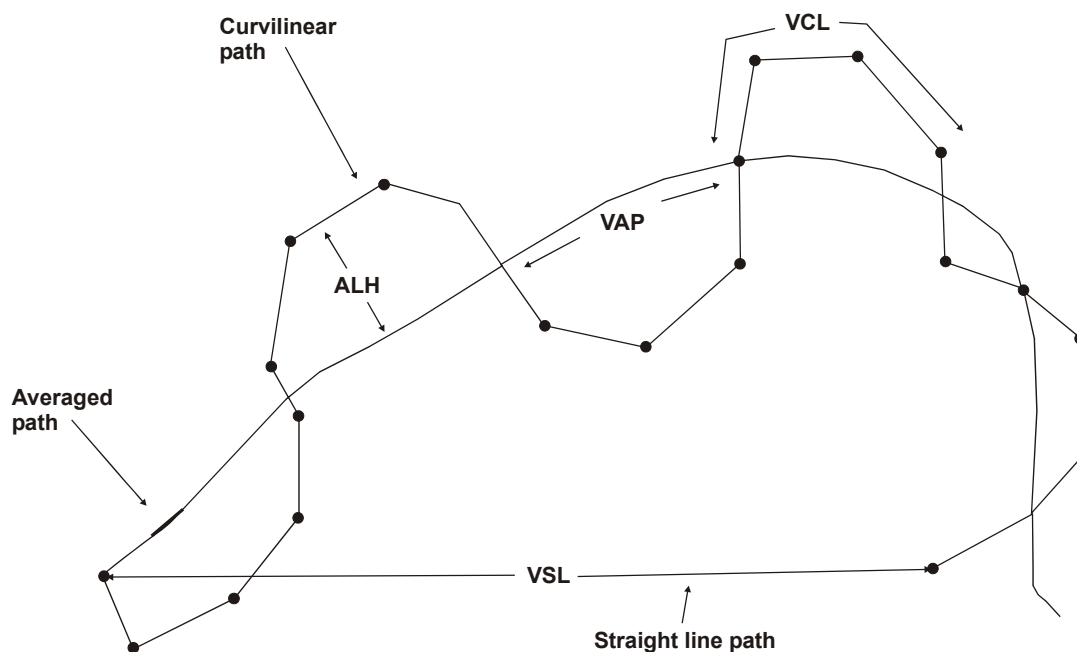
Die Motilität wurde computergestützt mittels des CASA-Systems (Stromberg-Mika) ermittelt. Das CASA-System (computer-assisted semen analysis) ermöglicht die Erkennung und objektive Messung der prozentualen Motilität, Spermatozoenbewegung, Spermatozoengeschwindigkeit und Spermatozoenkonzentration (Tab. 2, Abb. 3, Tab. 3).

Die Messungen erfolgten in einer Makler-Kammer (Kammertiefe 10 µm) bei 37°C.

Tabelle 2: CASA-Meßparameter und ihre Bedeutung (5)

| Parameter (Abkürzung)           | Bedeutung/Definition                           | Einheit         |
|---------------------------------|--|-----------------|
| Motilitätsrate (Mot)            | Anteil motiler Zellen                          | %               |
| Curve line velocity (VCL)       | Geschwindigkeit entlang der tatsächlichen Bahn | $\mu\text{m/s}$ |
| Averaged path velocity (VAP)    | Geschwindigkeit entlang der gemittelten Bahn   | $\mu\text{m/s}$ |
| Straight line velocity (VSL)    | Geschwindigkeit entlang der Luftlinie          | $\mu\text{m/s}$ |
| Lateral head displacement (LHD) | seitliche Kopfauslenkung                       | $\mu\text{m}$   |
| Beat frequency (BT)             | Kopf-/Schwanzschlagfrequenz                    | Hz              |
| Linearity (Lin)                 | Linearität = $VSL/VCL$                         | %               |
| Straightness (Str)              | Geradlinigkeit = $VSL/VAP$                     | %               |

Abb. 3: Darstellung von VCL, VSL und VAP (5)



**Tabelle 3: Klassifizierung von Spermatozoen (5)**

| <b>Klasse</b>            | <b>Bedingung</b>  |
|--------------------------|---|
| Immotil (IM)             | VAP < 10 $\mu\text{m/s}$  |
| Lokal motil (LoM)        | VAP > 10 $\mu\text{m/s}$ und < 30 $\mu\text{m/s}$                           |
| Motil (M)                | VAP > 30 $\mu\text{m/s}$  |
| <b>Unterklasse</b>       |   |
| Linear motil (LM)        | Motil, nicht-hyperaktiv und Geradlinigkeit > 90%                            |
| Nicht-linear motil (NLM) | Motil, nicht-hyperaktiv und Geradlinigkeit > 90%                            |
| Hyperaktiv (H)           | Motil, VCL > 80 $\mu\text{m/s}$ , Linearität < 65% und Kopfauslenkung < 6,5 |
| Kreisläufer (KL)         | Motil, keine andere Motilitätsklasse und Bahnradius < 8 $\mu\text{m}$       |

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurden nur Ejakulate mit <  $1 \times 10^6$  Leukozyten/ml und einer Motilität (WHO a + b) > 50% und einer progressiven Motilität (WHO a) > 25% verwendet.

### **2.3. Lokalisation von Mastzellen im menschlichen Eileiter**

Es wurden Gewebeproben immunhistochemisch mittels Avidin-Biotin-Peroxidase (38) untersucht mit der Frage, ob diese tryptasehaltige Mastzellen enthalten. Die Gewebeproben wurden von Frauen (n = 3; < 40 Jahre) nach Autopsie gewonnen, die keine Hinweise auf pathologische Prozesse bezüglich ihrer Geschlechtsorgane zeigten. Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Mayerhofer, Institut für Anatomie der LMU München, durchgeführt.

### **2.4. Lokalisation von PAR-2-Rezeptoren auf Spermatozoen**

Die immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen des PAR-2-Rezeptors wurden in ejakulierten Spermatozoen durchgeführt, die in 4% Paraformaldehyd, 0,1% Glutaraldehyd und in 0,05 M PBS bei einem pH-Wert von 7,4 fixiert waren. Die Markierung erfolgte mittels Lowicryl (K4M; Polysciences, Eppenheim, Germany) mit

einem PAR-2-Antikörper der Ziege und einem zweiten, gold-markierten Antiserum (1:20; 10 nm; Aurion, Wageningen, The Netherlands). Die Untersuchung erfolgte mit dem Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop.

Als Kontrolle wurde entweder kein Antiserum eingesetzt oder dieses durch normales Kaninchenserum ersetzt.

## **2.5. Messung von Tryptase im menschlichen Seminalplasma und in menschlicher Follikelflüssigkeit**

Für diese Untersuchung wurde frisches Ejakulat von Patienten (n = 114, Alter 18-65 Jahre) aus der andrologischen Ambulanz und von 25 gesunden Spendern (Alter 18 - 55 Jahre) gesammelt, die keinerlei Anamnese bezüglich Fertilitätsstörungen aufwiesen.

Die Spermatozoen wurde hierfür wie in 2.2. beschrieben vorbehandelt. Das Seminalplasma wurde durch wiederholte Zentrifugation (10000 U/min für 3 x 15 Minuten) gewonnen und anschließend die Tryptasekonzentration über einen kommerziell erhältlichen solid-phase Radioimmunoassay (Pharmacia tryptase RIACT) ermittelt. Die Bestimmungsgrenzen des Assays liegen bei 1 µg/l.

Zusätzlich wurden Spermatozoenanalysen nach der WHO (56) durchgeführt, die die Bestimmung des pH-Werts, des Volumens, der Gesamtspermatozoenzahl, der Spermatozoenkonzentration, der Beweglichkeit, der Morphologie (Shorr-Färbung), der Vitalität (Eosinfärbung), Peroxidase-positiver Leukozyten, der Granulozyten-elastase und der  $\alpha$ -Glucosidase beinhalteten.

Die Follikelflüssigkeit wurde von Frauen gewonnen (n = 8, Alter 32-39 Jahre), die sich einer In-vitro-Fertilisation in der gynäkologischen Gemeinschaftspraxis Drs. Bollmann/Brückner/Noss, Im Tal 5, 80331 München, unterzogen. Die Tryptasemessung erfolgte über den oben beschriebenen Immunoassay.

## **2.6. Effekte von Tryptase auf Spermatozoen**

Es wurden Stammlösungen von 100 µg/ml Tryptase in einer gepufferten Lösung (pH = 6,1) hergestellt, die 10 mM MES (Morpholinoethansulfonacid), 200 mM NaCl, 10%

Glycerol und 0,5 mg/ml Heparin enthielten. Aliquots wurden tiefgefroren bei -20°C gelagert.

Vor Experimentbeginn wurde die Stammlösung mit PBS versetzt (phosphate buffered saline) und nach Zugabe der Spermatozoensuspension (s. 2.2.) zu den Endkonzentrationen von 10, 100 und 1000 ng/ml verdünnt.

Als Kontrollen wurde Spermatozoenproben verwendet, die nur mit der Pufferlösung bzw. PBS versetzt wurden.

Nach 10, 30, 60 und 180 Minuten wurden mittels des CASA-Systems verschiedene Spermatozoenparameter bei einer Temperatur von 37°C ermittelt: Beweglichkeit (% WHO a/b/c), curve line velocity (VCL), averaged path velocity (VAP) und straight line velocity (VSL).

Da die Tryptase-Effekte am deutlichsten und schnellsten bei einer Endkonzentration von 1000 ng/ml erzielt wurden, wurde diese Konzentration für die weiteren Experimente verwendet.

## **2.7. Reversibilität des Tryptase-Effekts auf Spermatozoen**

Um die Rerversibilität des **Tryptase**-Effekts zu überprüfen, wurden die Spermatozoensuspensionen nach Inkubation der Spermatozoen mit 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml Tryptase für 60 Minuten zweimal mit Medicult Spermatozoenpräparationsmedium gewaschen und die Motilität nach 10 Minuten erneut bei einer Temperatur von 37°C bestimmt. Als Kontrolle wurde die Motilität von denselben Spermatozoenproben nach 60 Minuten bestimmt, denen Tryptase in einer Konzentration von 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml zugesetzt worden war und die danach keinem Waschvorgang unterzogen wurden.

## **2.8. Effekte von Chymase auf menschliche Spermatozoen**

Stammlösungen von 100 µg/ml **Chymase** in 2.0 M NaCl und 1 mM MOPS (3-N-morpholino-2-hydroxypropanesulfonicacid) mit einem pH-Wert von 6,8 wurden aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Vor Experimentbeginn wurde die Stammlösung mit PBS und der Spermatozoensuspension (s. 2.2.) zu den Endkonzentrationen von 10, 100 und 1000 ng/ml verdünnt.

Als Kontrollen wurden Spermatozoenproben verwendet, die nur mit der Pufferlösung bzw. PBS versetzt worden waren.

Nach 10, 30, 60 und 180 Minuten wurden verschiedene Spermatozoenparameter ermittelt: Beweglichkeit (% WHO a/b/c), curve line velocity (VCL), averaged path velocity (VAP) und straight line velocity (VSL).

## **2.9. Reversibilität des Chymase-Effekts auf Spermatozoen**

Um die Reversibilität des **Chymase**-Effekts zu überprüfen, wurden die Spermatozoenproben nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei einer Temperatur von 37°C mit 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml Chymase zweimal mit Medicult Spermatozoenpräparationsmedium gewaschen und die Motilität mit dem CASA-System nach 10 Minuten erneut bestimmt.

## **2.10. Hemmung des Tryptase-Effekts auf Spermatozoen mit monoklonalen Anti-Tryptase-Antikörpern der Maus**

Zur Überprüfung der Spezifität der Tryptase-Effekte auf Spermatozoen wurden Anti-Tryptase-Antikörper eingesetzt. Hierzu wurde zunächst eine Stammlösung von 100 µg/ml monoklonalen Maus-Anti-Tryptase-Antikörpern (in PBS, pH = 7,2) hergestellt und in Aliquots bei -20°C gelagert. Die eingesetzte Antikörperkonzentration betrug nach Verdünnung mit PBS und Zugabe der Spermatozoensuspension 1000 ng/ml.

Vor Exposition der Spermatozoen mit 1000 ng/ml Tryptase wurden die Proben 5 Minuten mit dem Antikörper der Konzentration 1000 ng/ml inkubiert und bei einer Temperatur von 37°C nach 30, 60 und 180 Minuten die Motilität bestimmt.

Als Kontrollen wurden unbehandelte Spermatozoen bzw. Spermatozoen, die nur mit dem Antikörper bzw. nur mit Tryptase inkubiert wurden, eingesetzt.

## **2.11. Effekte des polyklonalen PAR-2-Rezeptor-Antikörpers (proteinase-activated receptor 2 c17: sc 8205) der Ziege auf Spermatozoen**

Um den Effekt des PAR-2-Antikörpers auf Spermatozoen zu untersuchen, wurden Stammlösungen von 100 ng/ml PAR-2-Antikörper der Ziege (in PBS, pH = 7,2) hergestellt und anschließend bei -20°C tiefgefroren.

Für die Experimente wurde die Antikörper-Stammlösung mit PBS-Puffer, der 0,1% Natriumazid und 0,2% Gelatine enthielt, nach Zugabe der Spermatozoensuspension verdünnt (s. 2.2.), so dass der Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml, 100 ng/ml und 1 ng/ml vorlag.

Fünf Minuten nach Inkubation der einzelnen Antikörperkonzentrationen mit der Spermatozoensuspension (s. 2. 2.) wurde Tryptase (10 µg/ml) zugefügt, so dass die einzelnen Suspensionen als Endkonzentration 1000 ng/ml Tryptase enthielten. Die Motilität wurde anschließend bei einer Temperatur von 37°C nach 30, 60 und 180 Minuten bestimmt.

Als Kontrollen wurden unbehandelte Spermatozoen bzw. Spermatozoen, die nur mit dem Antikörper bzw. nur mit Tryptase inkubiert wurden, eingesetzt.

## **2.12. Statistische Analyse**

Die erhobenen Daten wurden als Mittelwerte mit Einbezug der Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Vergleiche wurden mit ANOVA durchgeführt, gefolgt vom Scheffe-Test. Alle Tests wurden doppelseitig durchgeführt. Die Analysen erfolgten mittels SPSS 11.0 Software.

P - Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Tryptase im menschlichen Seminalplasma und menschlicher Follikelflüssigkeit

Tryptase konnte in 14,4% der 114 untersuchten Seminalplasmaproben von Patienten der andrologischen Sprechstunde gemessen werden. Im Mittel enthielten die Proben 4,18 (Standardabweichung  $\pm$  1,95) ng/ml Tryptase. Die Werte lagen zwischen 1 ng/ml (untere Bestimmungsgrenze) und 18,7 ng/ml Tryptase (Abb. 4). In den Seminalplasmaproben gesunder Spender (n = 25) konnte in 20% der Seminalplasmaproben ein Tryptasemittelwert von 1,66 (Standardabweichung  $\pm$  0,65) ng/ml nachgewiesen werden (Abb. 5).

Die Patienten, die erhöhte Tryptasewerte aufwiesen, zeigten eine leere Atopieanamnese und wiesen normwertige Gesamt-IgE-Werte auf. Bei einem der untersuchten Patienten war eine Mastozytose bekannt.

Die Tryptasewerte korrelierten nicht mit den gleichzeitig bestimmten Spermatozoenparametern (Konzentration, Beweglichkeit, Morphologie, Peroxidase-positive Leukozyten, Granulozyten-Elastase).

Die Tryptasekonzentrationen in der Follikelflüssigkeit lagen zwischen 1,60 ng/ml und 3,73 ng/ml.

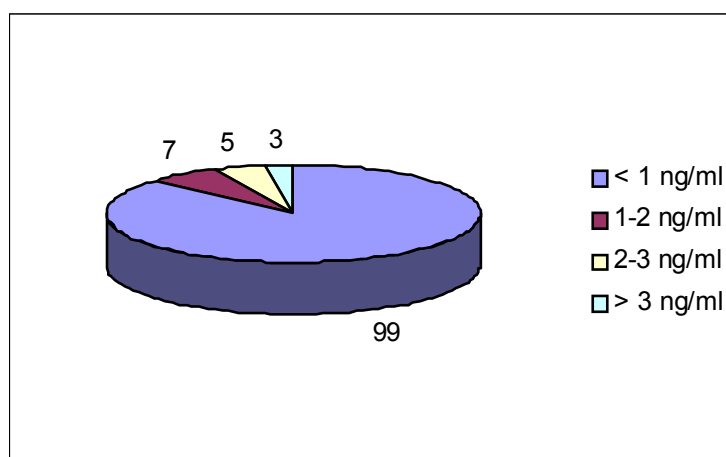


Abb. 4: Tryptasekonzentrationen im Seminalplasma von 114 Patienten der andrologischen Ambulanz. In 14,4% der untersuchten Proben konnte Tryptase nachgewiesen werden bei einem Mittelwert von 4,18 (Standardabweichung  $\pm$  1,95) ng/ml Tryptase.

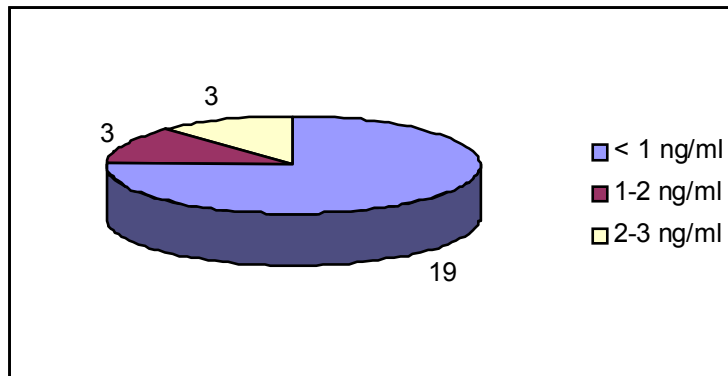


Abb. 5: Tryptasekonzentrationen im Seminalplasma von 25 gesunden Spendern. In 20% der untersuchten Proben konnte Tryptase nachgewiesen werden bei einem Mittelwert von 1,66 (Standardabweichung  $\pm 0,65$ ) ng/ml Tryptase.

### 3.2. Immunhistochemische Bestimmung der Lokalisation von Mastzellen im menschlichen Eileiter

Immunreaktive, tryptasehaltige Mastzellen konnten in der Muskelschicht und im subepithelialen Bindegewebe von Eileitern lokalisiert werden (Abb. 6). Alle Kontrollen waren negativ (nicht abgebildet).

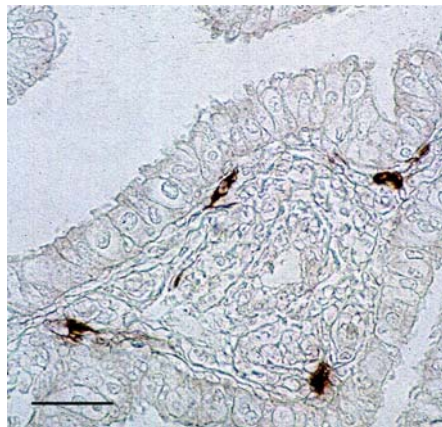


Abb. 6: Immunhistochemische Lokalisation von tryptasehaltigen Mastzellen im menschlichen Eileiter. Es sind vier, subepithelial lokalisierte Mastzellen dargestellt.  
Skalierung: 40  $\mu\text{m}$

### 3.3. Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von PAR-2-Rezeptoren auf humanen Spermatozoen

PAR-2-Rezeptoren wurden in der Plasmamembran und in der äußeren akrosomalen Membran menschlicher Spermatozoen lokalisiert. Darüber hinaus konnten PAR-2-Rezeptoren in der Plasmamembran des Flagellums gefunden werden. Alle Kontrollen waren negativ (Abb. 7).

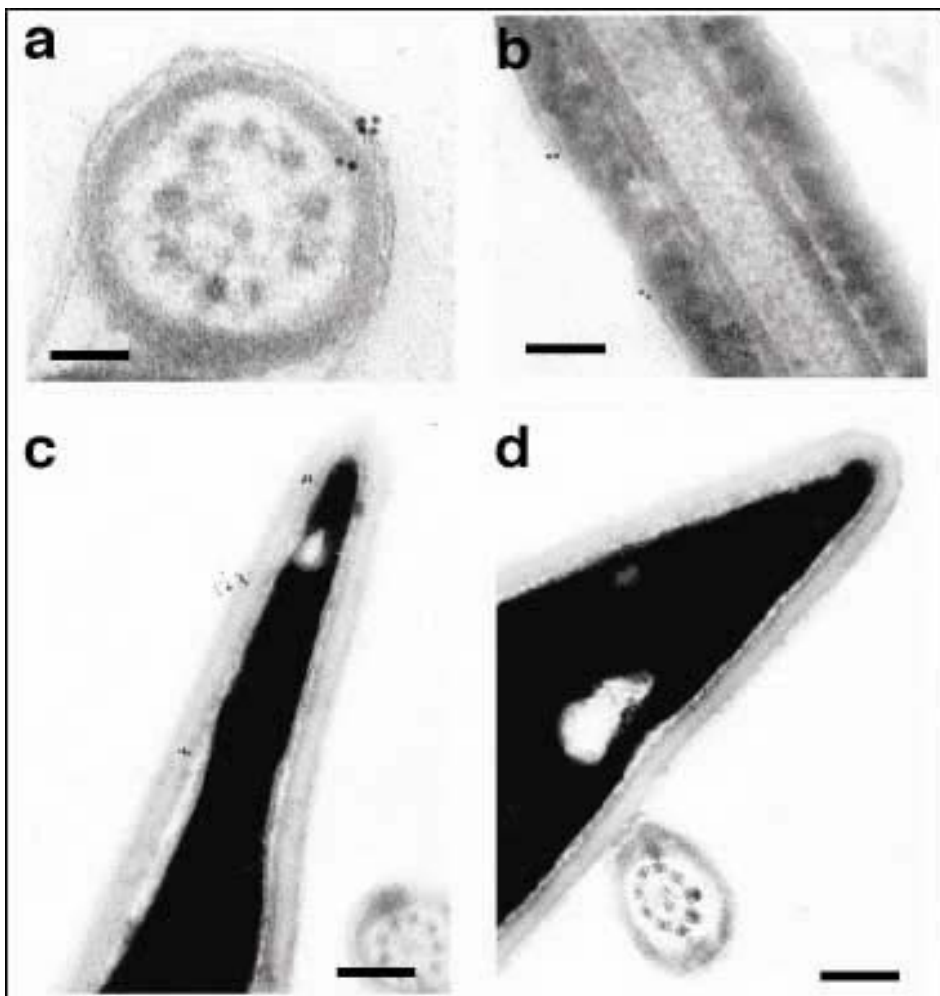


Abb. 7: Immunelektronenmikroskopisches Bild von PAR-2-Rezeptoren auf humanen Spermatozoen. Die Rezeptoren befinden sich in der Plasmamembran des Akrosoms und des Flagellums. Kontrollen (ohne Einsatz des Antikörpers) sind in (d) aufgezeigt.

Skalierung: **a** = 250 nm; **b** = 100 nm; **c** = 200 nm; **d** = 150 nm

### 3.4. Effekte von Tryptase auf die menschliche Spermatozoenmotilität

Der Gesamtmotilität von Spermatozoen gesunder Spender ( $n = 12$ ) wurde von Tryptase dosis- und zeitabhängig reduziert. Nach einer Inkubationszeit von **10 Minuten** mit 1000 ng/ml Tryptase verringerte sich die Gesamtmotilität der Spermatozoen signifikant ( $p = 0,045$ ) (Abb. 8). Die ebenfalls bestimmten Motilitätsparameter (VCL, VAP, VSL) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

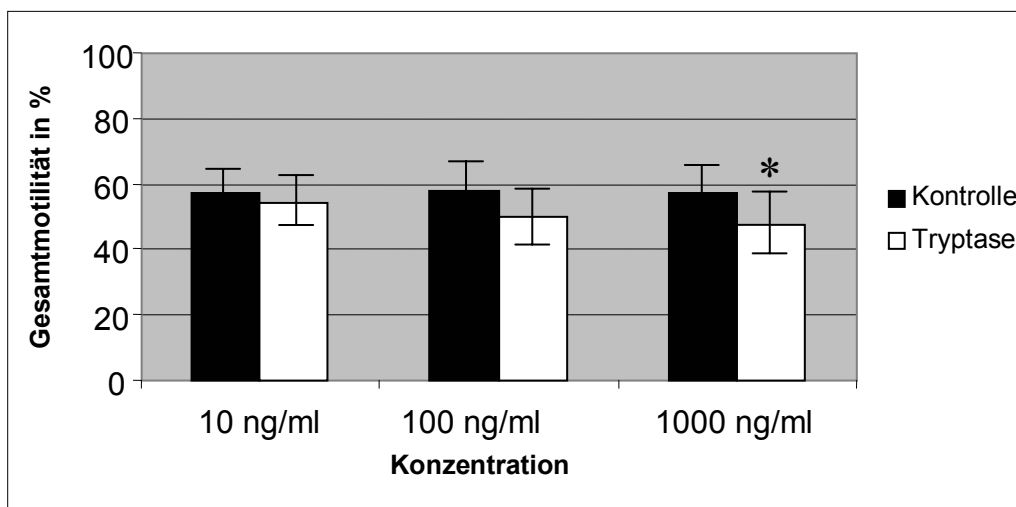


Abb. 8: Effekte von Tryptase auf die Gesamtmotilität von Spermatozoen nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,045$ ) im Vergleich zur Kontrolle an.

Nach **30 Minuten** wurde die Gesamtmotilität der Spermatozoen in Proben mit einer Tryptasekonzentration von 100 ng/ml und 1000 ng/ml signifikant reduziert (100 ng/ml:  $p = 0,037$ , 1000 ng/ml:  $p < 0,01$ ) (Abb. 9). Die ebenfalls bestimmten Motilitätsparameter (VCL, VAP, VSL) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

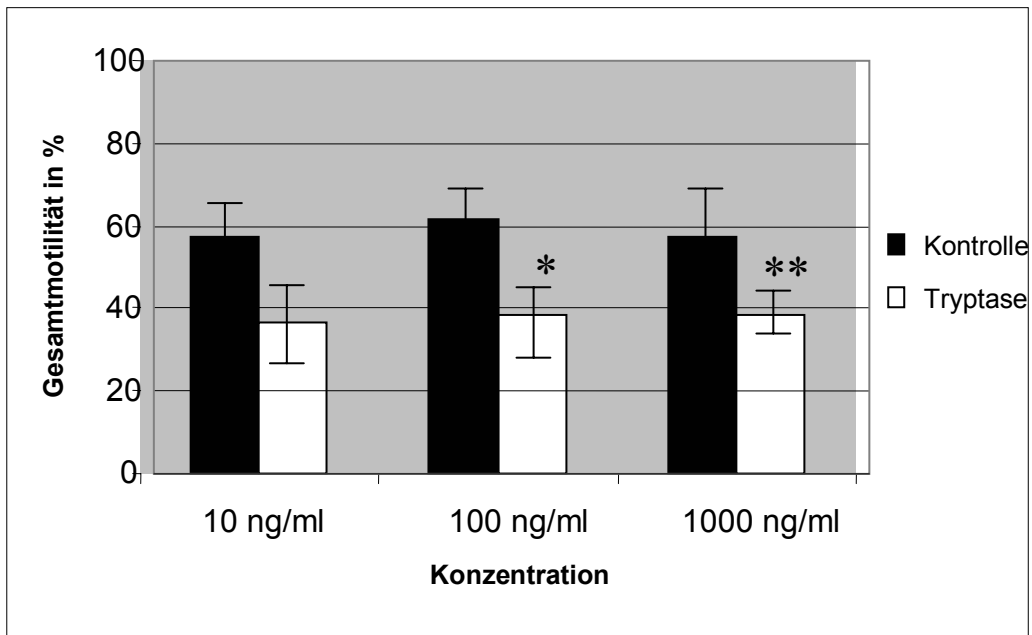


Abb. 9: Effekte von Trypsin auf die Gesamtmotilität von Spermatozoen (n = 12) nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied bei 100 ng/ml Trypsin ( $p = 0,037$ ), \*\* den statistisch signifikanten Unterschied bei 1000 ng/ml Trypsin ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrolle an.

Nach einer Inkubationszeit von **60 Minuten** konnte eine signifikante Reduktion der Gesamtmotilität der Spermatozoen bei allen verwendeten Trypsinkonzentrationen beobachtet werden (10 ng/ml:  $p = 0,046$ , 100 ng/ml:  $p < 0,05$ , 1000 ng/ml:  $p < 0,01$ ) (Abb. 10). Die ebenfalls bestimmten Motilitätsparameter (VCL, VAP, VSL) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

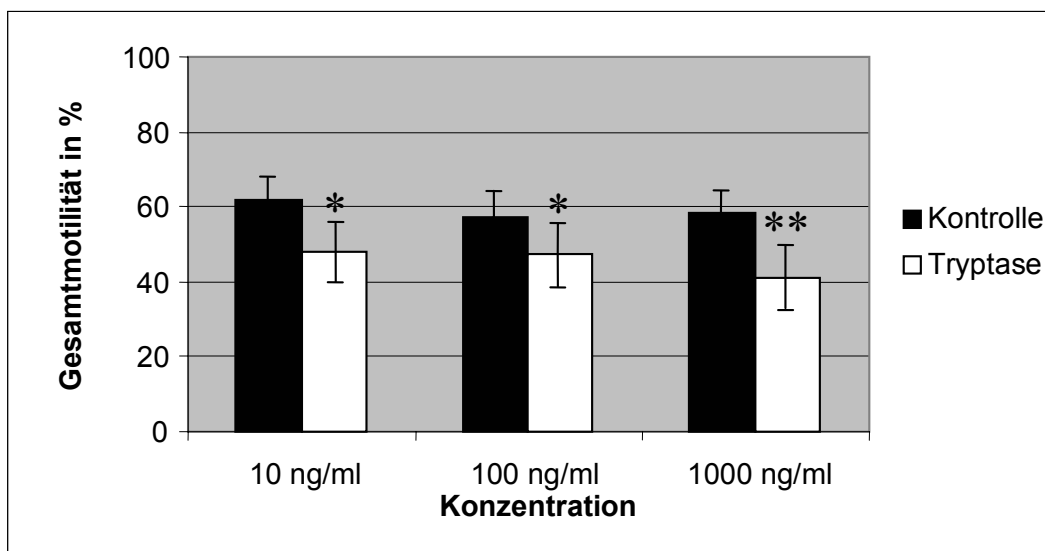


Abb. 10: Effekte von Tryptase auf die Gesamtmotilität von Spermatozoen (n = 12) nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied bei 10 ng/ml Tryptase ( $p = 0,046$ ) und 100 ng/ml Tryptase ( $p < 0,05$ ), \*\* den statistisch signifikanten Unterschied bei 1000 ng/ml Tryptase ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrolle an.

**180** Minuten nach Zugabe von Tryptase zeigte die Gesamtmotilität der Spermatozoen eine weitere signifikante Abnahme bei allen verwendeten Tryptasekonzentrationen (10 ng/ml:  $p < 0,05$ , 100 ng/ml:  $p < 0,01$ , 1000 ng/ml:  $p < 0,001$ ) (Abb. 11). Die ebenfalls bestimmten Motilitätsparameter (VCL, VAP, VSL) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

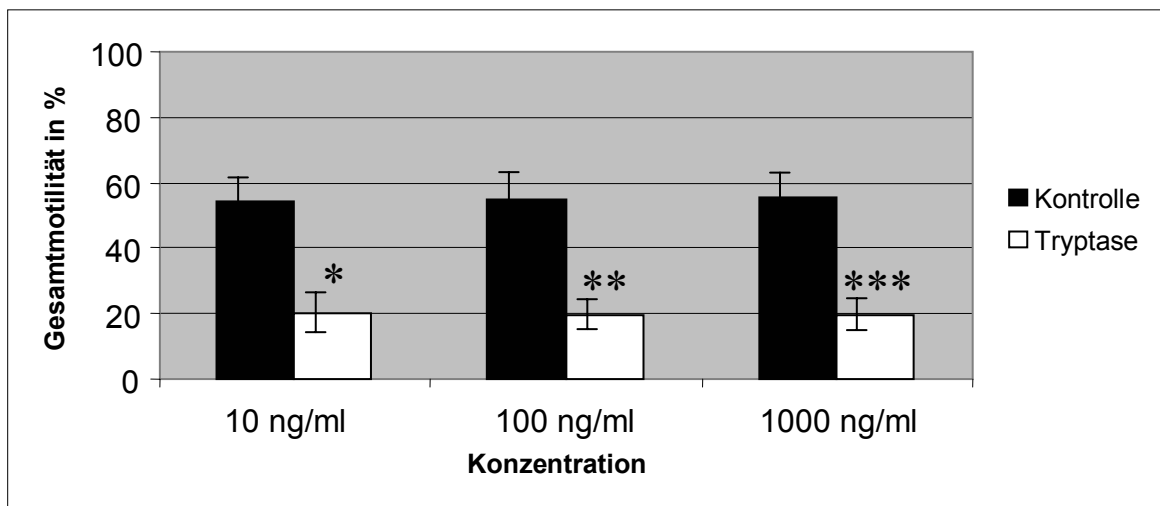


Abb. 11: Effekte von Tryptase auf die Gesamtmotilität von Spermatozoen (n = 12) nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied bei 10 ng/ml Tryptase ( $p < 0,05$ ), \*\* den statistisch signifikanten Unterschied bei 100 ng/ml Tryptase ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* den statistisch signifikanten Unterschied bei 1000 ng/ml Tryptase ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Kontrolle an.

### 3.5. Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Tryptase-Effekts auf die Spermatozoenmotilität

Abb. 12 zeigt, dass im Vergleich zu den Kontrollen eine statistisch signifikante Abnahme der Gesamtmotilität schon nach 10 Minuten bei Inkubation mit 1000 ng/ml Tryptase zu beobachten war. Bei 100 ng/ml Tryptase war eine signifikante Abnahme

der Gesamtmotilität erst nach 30 Minuten Inkubationszeit zu erkennen, bei 10 ng/ml Tryptase erst bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten. Nach einer Inkubation von 180 Minuten war bei allen eingesetzten Tryptasekonzentrationen (10, 100, 1000 ng/ml) eine statistisch signifikante Reduktion der Gesamtmotilität im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

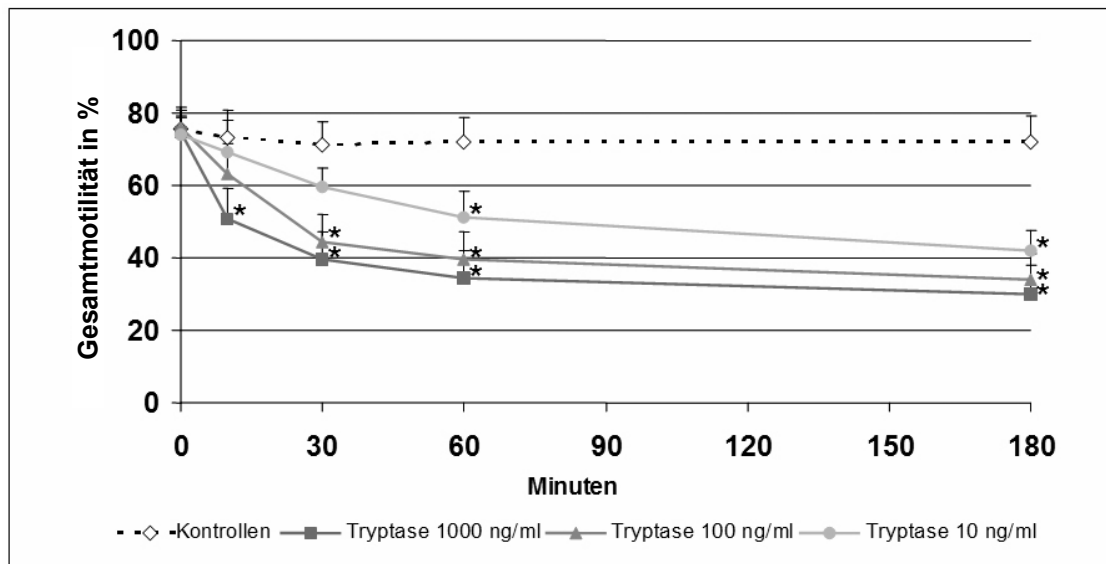


Abb. 12: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Tryptaseeffekts auf die Spermatozoenmotilität.

\* zeigt die statistisch signifikante Abnahme ( $p < 0,05$ ) der Gesamtmotilität im Vergleich zum Ausgangswert an.

### 3.6. Effekte von Chymase auf die menschliche Spermatozoenmotilität

Eine Inkubation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml der Serinprotease Chymase hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Spermatozoengesamtmotilität gesunder Spender ( $n = 12$ ). Die Inkubation mit 1000 ng/ml Chymase führte jedoch nach 60 Minuten zu einer signifikanten Abnahme ( $p = 0,042$ ) der Gesamtmotilität (Abb. 13). Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 180 Minuten zeigte keine weiteren Veränderungen (Abb. 13). Die ebenfalls bestimmten Motilitätsparameter (VCL, VAP, VSL) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

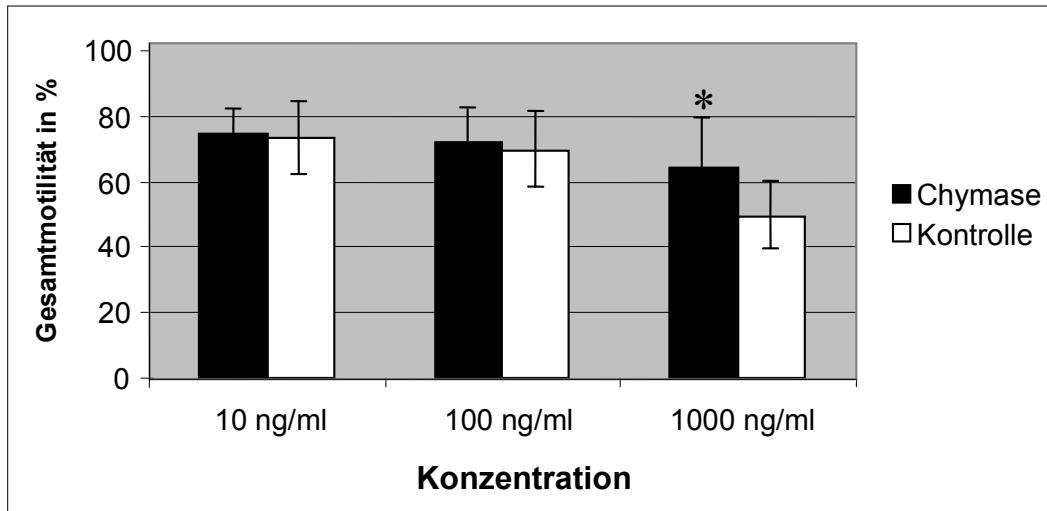


Abb. 13: Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten mit Chymase (1000 ng/ml) kam es zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtmotilität ( $n = 12$ ). \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,042$ ) im Vergleich zur Kontrolle an.

### 3.7. Reversibilität des Effekts von Tryptase auf menschliche Spermatozoen

Der hemmende Einfluß von Tryptase auf die Spermatozoengesamtmotilität erwies sich als reversibel. Durch zweimaliges Waschen der Spermatozoenproben ( $n = 6$ ) nach Inkubation mit 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml Tryptase für 60 Minuten erreichte die Gesamtmotilität Werte, die mit denen der Kontrollen vergleichbar waren ( $p = 0,014$ ) (Abb. 14). Die ebenfalls bestimmten Motilitätsparameter (VCL, VAP, VSL) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

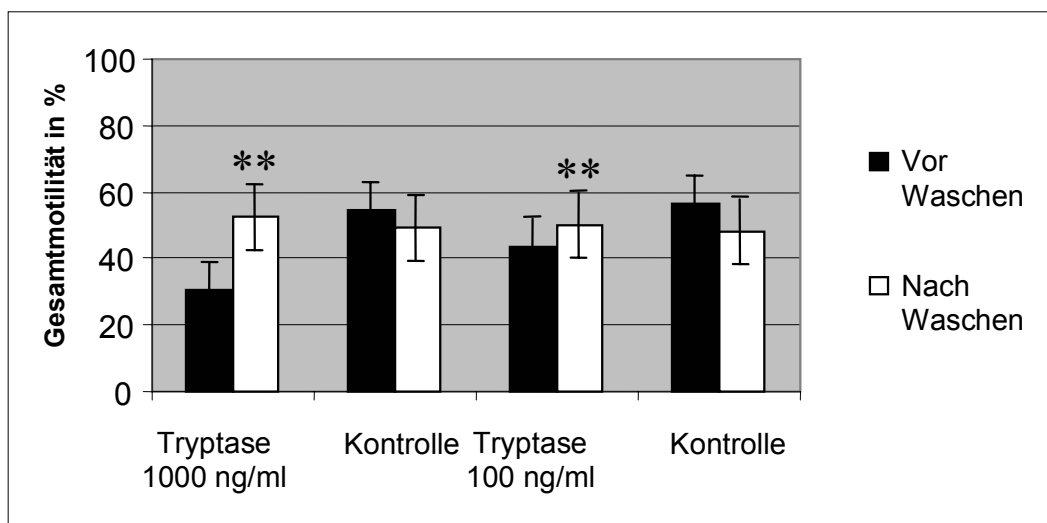




Abb. 14: Reversibilität des Effekts von 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml Tryptase auf die Spermatozoenmotilität nach 60 Minuten. \*\* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,014$ ) im Vergleich zur Kontrolle an.

### 3.8. Irreversibilität des Effekts von Chymase auf die Motilität menschlicher Spermatozoen

Wie in 3.6. dargestellt, war nach Inkubation mit 1000 ng/ml Chymase ein signifikanter Abfall der Gesamtmotilität zu erkennen.

Im Gegensatz zu Tryptase jedoch war dieser Effekt bei Chymase nicht reversibel. Nach Inkubation der Spermatozoen ( $n = 3$ ) mit 1000 ng/ml Chymase für 60 Minuten und zweimaligem Waschen war eine weitere Abnahme der Gesamtmotilität zu beobachten (Abb. 15). Die ebenfalls bestimmten Motilitätsparameter (VCL, VAP, VSL) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

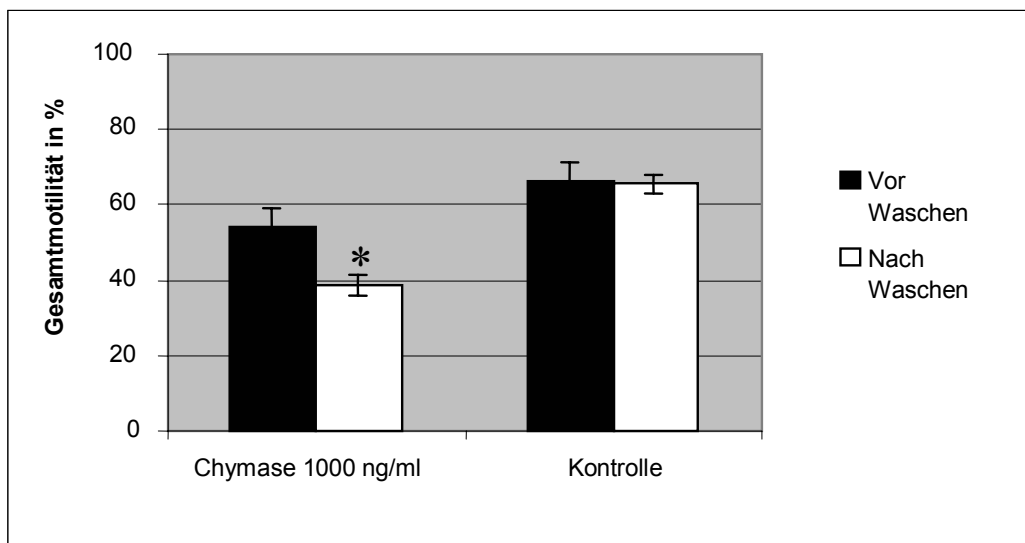


Abb. 15: Irreversibilität von Chymase (1000 ng/ml) auf die Spermatozoengesamtmotilität. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,042$ ) im Vergleich zur Kontrolle an.

### 3.9. Inhibition der Tryptasewirkung auf die Spermatozoenmotilität durch Anti-Tryptase-Antikörper der Maus

Zur Überprüfung der Spezifität des Tryptaseeffekts auf die Motilität menschlicher Spermatozoen wurden Spermatozoenproben gesunder Spender ( $n = 7$ ) nach Inkubation mit Anti-Tryptase-Antikörper der Maus (1000 ng/ml) mit Tryptase (1000 ng/ml) versetzt und nach 30, 60 und 180 Minuten die Gesamtmotilität bestimmt.

In den mit dem Antikörper vorbehandelten Proben zeigte sich ein signifikant höherer Anteil motiler Spermatozoen (30 min.:  $p = 0,006$ ; 60 min.:  $p = 0,003$ ; 180 min.:  $p = 0,004$ ) im Vergleich zu den Proben, die nur mit Tryptase behandelt wurden (Abb. 16). Die ebenfalls bestimmten Motilitätsparameter (VCL, VAP, VSL) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

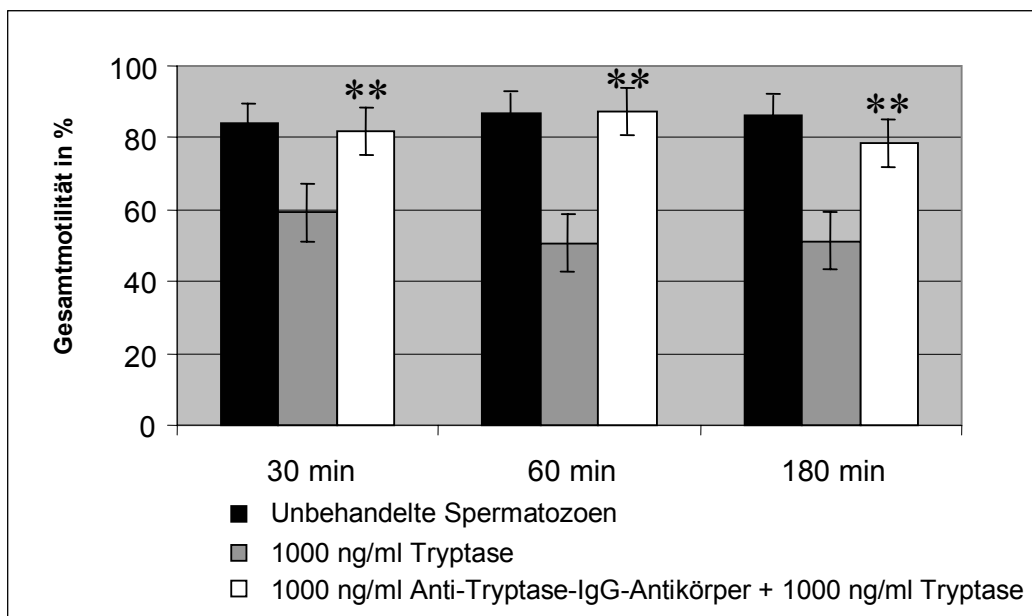


Abb. 16: Inhibition der Tryptasewirkung auf die Spermatozoengesamtmotilität durch Anti-Tryptase-Antikörper. \*\* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle nach 30 Minuten ( $p = 0,006$ ), 60 Minuten ( $p = 0,003$ ) und 180 Minuten ( $p = 0,004$ ) Inkubation mit Anti-Tryptase-Antikörpern.

### 3.10. Verhinderung der Tryptaseeffekte auf die Spermatozoenmotilität durch Vorinkubation mit PAR-2-Rezeptor-Antikörpern

Spermatozoen gesunder Spender ( $n = 6$ ), welche mit 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml Anti-PAR-2 Antikörper vorbehandelt und anschließend mit 1000 ng/ml Tryptase inkubiert wurden, zeigten nach 30, 60 und 180 Minuten eine statistisch signifikante höhere Gesamtmotilität (30 min.:  $p = 0,013$ ; 60 min.:  $p = 0,004$ ; 180 min.:  $p = 0,001$ ) als ausschließlich mit Tryptase versetzte Proben (Abb. 17). Die ebenfalls bestimmten Motilitätsparameter (VCL, VAP, VSL) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

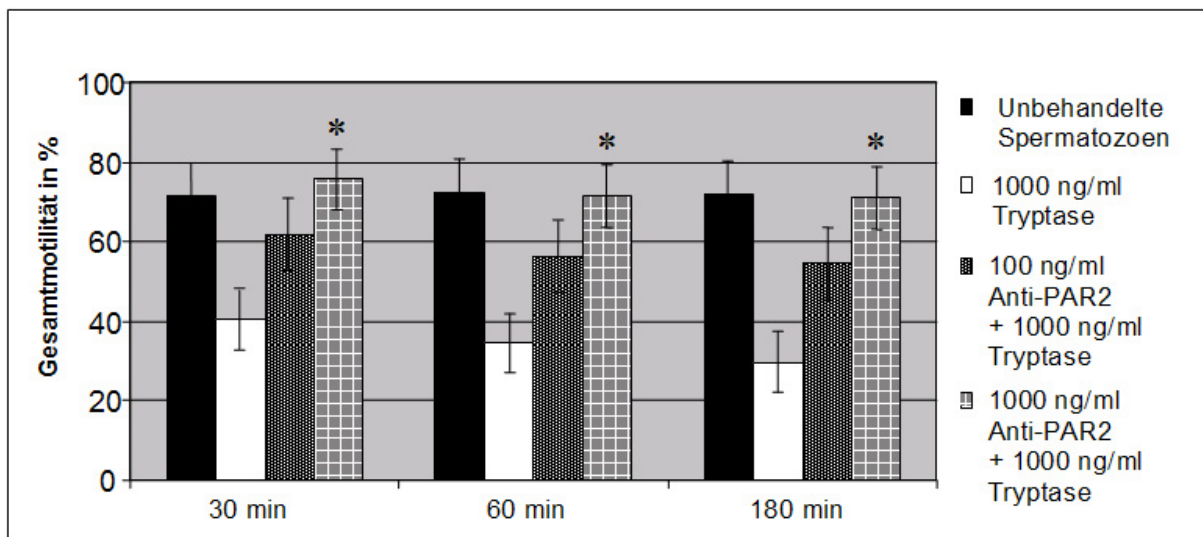


Abb. 17: Verhinderung der Tryptaseeffekte auf die Spermatozoengesamtmotilität ( $n = 6$ ) durch Vorinkubation mit PAR-2-Rezeptor-Antikörpern. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu den tryptasehaltigen Proben nach 30 Minuten ( $p = 0,013$ ), 60 Minuten ( $p = 0,004$ ) und 180 Minuten ( $p = 0,001$ ) Inkubation mit PAR-2-Rezeptor-Antikörpern an.

#### 4. Diskussion

Tryptase und Chymase sind die für Mastzellen spezifischen Proteasen (26). Tryptase ist in allen menschlichen Mastzellen enthalten (26) und eine erhöhte Anzahl von Mastzellen ist in Hoden infertiler Männer nachweisbar (28, 19).

Da Tryptase im Rahmen dieser Arbeit im Seminalplasma bestimmt und Mastzellen im Tubenepithel nachgewiesen werden konnten, war es von herausragendem Interesse, mögliche direkte Effekte von Mastzellproteasen, v.a. von Tryptase, auf Spermatozoen zu untersuchen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tryptase die Motilität humaner Spermatozoen zeit- und konzentrationsabhängig verringert.

Es konnte weiterhin demonstriert werden, dass diese Effekte über PAR-2-Rezeptoren vermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten PAR-2-Rezeptoren erstmals an der Membran des Akrosoms und des Mittelstücks menschlicher Spermatozoen lokalisiert werden.

Nach Blockierung des PAR-2-Rezeptors durch einen PAR-2-Rezeptor-Antikörper konnte der hemmende Effekt von Tryptase auf Spermatozoen verhindert werden.

Ebenfalls konnten im Rahmen dieser Experimente tryptasehaltige Mastzellen in der menschlichen Eileiterwand detektiert werden, so dass anzunehmen ist, dass Tryptase auch in der Tubenflüssigkeit enthalten ist. Somit ist es möglich, dass Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt mit Tryptase in Kontakt kommen können.

Die Serinprotease Tryptase ist in allen menschlichen Mastzellen enthalten (26). Im menschlichen Hoden sind Mastzellen vor allem im Interstitium und der Lamina propria lokalisiert. Bei Patienten mit einer Varikozele, obstruktiver oder idiopathischer Azoospermie überwiegt der Anteil der MC<sub>TC</sub>-Zellen signifikant. Generell ist die Anzahl testikulärer Mastzellen bei Patienten mit einer idiopathischen Azoospermie signifikant erhöht (28, 19). Bisher deutet nur eine Arbeit darauf hin, dass bei gesunden Patienten der MC<sub>T</sub>-Typ dominiert, während eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Anzahl von MC<sub>TC</sub>-Zellen und dem Grad der Sklerosierung bei Patienten mit sklerosierten Tubuli seminiferi besteht (59). Untersuchungen zeigten, dass Patienten mit normaler Spermatogenese Mastzellen in intertubulären Bereichen aufweisen.

Patienten mit Spermatogenese-Arrest und Sertoli–Cell–Only–Syndrom zeigen eine statistisch signifikante Erhöhung der Zahl von Mastzellen in den Tubuli seminiferi bei gleichzeitiger Verdickung der Tubuli (29). Somit ist es möglich, einen Zusammenhang zwischen der Zahl von Mastzellen im menschlichen Hoden und Störungen der Spermatogenese bzw. testikulärer Fibrose herzustellen.

Bei Patienten mit eingeschränkter Spermatogenese und verdickten Tubulusmembranen ist die Anzahl tryptasehaltiger Mastzellen, Produkte ihrer Granulation und ihre Aktivität erhöht (59). Somit wäre ein direkter Kontakt von Mastzellproteasen mit testikulären Spermatozoen möglich. Welchen direkten Einfluss Serinproteasen, im besonderen Tryptase und Chymase, auf die Spermatogenese oder die Motilität humaner Spermatozoen ausüben, war bis jetzt unbekannt.

Mastzellen wurden bereits zuvor im weiblichen Genitaltrakt entdeckt (24, 41, 53, 50); jedoch ist bislang unklar, ob hier ebenfalls erhöhte Tryptasekonzentrationen festzustellen sind.

Effekte von Mastzellproteasen auf Spermatozoen könnten z.B. Erklärungen für Motilitätsstörungen von Patienten liefern und neue Therapieansätze ermöglichen.

Der PAR-2-Rezeptor spielt eine große Rolle bei der Aktivierung von Fibroblasten (18). Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor wird von Keratinozyten, Fibroblasten, Enterozyten, Endothelialzellen, glatten Muskelzellen, T-Zellen, bestimmten Tumorzellen und im Keimepithel exprimiert (14).

Nach Reaktion des Rezeptors mit der Tryptase und anschließender Hoch-Regulation von Cyclooxygenase 2 (COX-2) kommt es zu einer Zunahme der Fibroblastenaktivität (18).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Tryptase die Fähigkeit besitzt, zeit- und konzentrationsabhängig die Motilität von Spermatozoen gesunder Probanden statistisch signifikant zu verringern.

Dieser Effekt erwies sich als reversibel, da das Auswaschen der Protease wieder zu einem Anstieg der Motilitätsparameter führte. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da PAR-2-Rezeptoren, an denen Tryptase bindet, single – use – Rezeptoren sind, deren N-amino-terminales Ende nach Tryptasebindung so verändert wird, dass das Enzym

gebunden bleibt und somit der Rezeptor funktionell inaktiviert wird (6). Trotzdem konnte nach Tryptaseentfernung eine statistisch signifikante Zunahme der Gesamtmotilität beobachtet werden.

Der motilitätshemmende Effekt von Tryptase ist als spezifisch zu betrachten, da bei Anwesenheit eines Anti-Tryptase-IgG-Antikörpers die Motilitätsabnahme, die bei Zugabe von Tryptase zu beobachten war, nicht eintrat.

Die PAR-2-Rezeptoren konnten im Rahmen der dargestellten Experimente am Akrosom und Mittelstück menschlicher Spermatozoen lokalisiert werden. Darüber hinaus konnte aufgezeigt werden, dass durch Blockung des PAR-2-Rezeptors durch Vorinkubation mit einem PAR-2-Rezeptor-Antikörper die Hemmung der Motilität durch Tryptase verhindert werden konnte.

Zusammenfassend deuten die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse darauf hin, dass Tryptase einen direkten, spezifischen, PAR-2-Rezeptor-vermittelten Einfluss auf die Motilität menschlicher Spermatozoen ausübt.

Bei Inkubation mit Chymase in höheren Konzentrationen war ebenfalls eine Abnahme der Gesamtmotilität der Spermatozoen zu beobachten. Im Gegensatz zu Tryptase zeigte sich hier jedoch ein irreversibler Effekt.

Aufgrund dieser Beobachtungen scheint die Wirkung von Chymase auf humane Spermatozoen auf rein proteolytischen Effekten zu beruhen, und nicht auf Interaktionen über einen spezifischen Rezeptor.

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass Chymase und Tryptase die Motilität humaner Spermatozoen über zwei verschiedene Mechanismen beeinflussen.

Die direkten, hemmenden Effekte von Tryptase und die proteolytische Wirkung von Chymase auf Spermatozoen könnten sowohl im männlichen als auch im weiblichen Genitaltrakt eine Rolle spielen. Der Kontakt von Tryptase und Chymase mit Spermatozoen wäre in den Tubuli seminiferi, aber auch z.B. im Nebenhoden, möglich und könnte bereits hier negative Einflüsse auf die Spermatogenese bewirken. Da Mastzellen im Rahmen der hier dargestellten Untersuchung auch im Tubenepithel nachgewiesen werden konnten, wäre es denkbar, dass Spermatozoen während der Migration im weiblichen Genitaltrakt mit Tryptase in Kontakt kommen.

Verschiedene Studien berichteten, dass sich bei Patienten mit idiopathischer Infertilität nach Gabe von Mastzellblockern wie Ketotifen, Tranilast oder Rizaben die Spermatozoenkonzentration und ihre Motilität verbessert (42, 58, 23). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liefern die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten hemmenden Effekte von Tryptase auf die Motilität humaner Spermatozoen und die Assoziation zwischen Mastzellen und Tubulusschäden.

Der bei einer placebo-kontrollierten Studie eingesetzte Mastzellblocker Rizaben bewirkte darüber hinaus sogar im Vergleich zur Placebogruppe eine um 28,6% erhöhte Schwangerschaftsrate (58). Die Ursache für diesen Effekt ist nicht geklärt.

Möglicherweise wird mittels dieser Präparate eine Degranulation der in den menschlichen Hoden und Nebenhoden lokalisierten Mastzellen verhindert (34). Somit könnten fibrotische Prozesse und die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Effekte von Tryptase und Chymase auf Spermatozoen durch einen dauerhaften Einsatz von Mastzellblockern gedämpft werden. Da tryptasehaltige Mastzellen vermehrt in Tubuli seminiferi von Patienten mit Spermatogenesestörungen (Sertoli-Cell-Only-Syndrom, Spermatogenese-Arrest) vorkommen (29), wäre ein erfolgreicher Einsatz von Mastzellblockern auch hier denkbar.

Zu beachten ist jedoch, dass die Studien aufgrund geringer Patientenzahlen und relativ kurzer Behandlungsdauer mit Mastzellblockern methodische Mängel aufweisen und mit Vorsicht interpretiert werden müssen. Es existieren ebenfalls Untersuchungen, die von keiner Verbesserung der Spermatozoenparameter nach Gabe von Mastzellblockern berichten (11).

Untersuchungen zeigten, dass humane Fibroblasten unter Tryptaseeinfluss, PAR-2-Rezeptor-vermittelt, proliferieren und die Synthese von COX-2 als Schrittmacherezym der Prostaglandinsynthese induzieren. Folge der Fibroblastenstimulation ist die Synthese diverser Prostaglandine, wobei Prostaglandin J<sub>2</sub> und sein Metabolit 15d-PGJ<sub>2</sub> das Fibroblasenwachstum fördern. Die Blockierung von COX-2 mit einem COX-2-Hemmstoff (Meloxicam) verhindert die tryptase-induzierten, fibroproliferativen Vorgänge. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Expression von COX-2 nur in Hoden mit gestörter Spermatogenese stattfindet, jedoch nicht bei Gesunden (18).

Da Tryptase ihren fibroproliferativen Effekt über Aktivierung des PAR-2-Rezeptors und anschließende Freisetzung der Cyclooxygenase 2 (COX-2) vermittelt, ist ebenfalls

denkbar, dass eine Blockade dieses Enzyms durch COX-2-Antagonisten bei Patienten mit Spermatogenesestörungen und beginnender Tubulusfibrose vorteilhaft sein könnte (18). Bis jetzt sind diese Präparate vor allem in der antientzündlichen, aber auch in der Therapie fibroproliferativer Erkrankungen zum Einsatz gekommen (20, 21).

Cincik et al. (12) konnten zeigen, dass Patienten mit einer erhöhten Mastzellkonzentration in ihren Ejakulaten pathologische Spermatozoenparameter aufwiesen. 21% der von ihnen untersuchten Patienten (n = 400) hatten eine erhöhte Mastzellkonzentration in ihren Ejakulaten. In dieser Patientengruppe war, im Vergleich zu Patienten, die keine Mastzellen in ihren Ejakulaten aufwiesen, die progressive Motilität der Spermatozoen signifikant erniedrigt. Darüber hinaus wurde bei Patienten mit mastzellhaltigen Ejakulaten eine statistisch signifikante Erhöhung von morphologisch veränderten Spermatozoen beobachtet. Kritisch ist anzumerken, dass eine exakte Klassifizierung der morphologischen Veränderungen nicht vorgenommen wurde. Ebenso wird keine Aussage über den Ursprung der in den Ejakulaten bestimmten Mastzellen getroffen.

Die eigenen Resultate unterstützen diese Ergebnisse teilweise, da aufgezeigt werden konnte, dass Tryptase und Chymase als Mastzellprodukte eine Abnahme der Motilität humaner Spermatozoen bewirken und somit die Erklärung für den negativen Effekt von Mastzellen auf die Beweglichkeit von Spermatozoen sein könnten.

In der hier vorgelegten Studie konnte Tryptase in 14,4% der untersuchten Ejakulate nachgewiesen werden, die von 114 Patienten aus der andrologischen Ambulanz und von 25 gesunden Spendern stammten. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tryptaseeffekten hatte Tryptase eine Mindestkonzentration von 10 ng/ml (12 mU/ml). Diese Konzentration wurde in 2,3% der untersuchten Ejakulate erreicht. Diese waren mit Tryptasekonzentrationen vergleichbar, die im Atemtrakt von Hunden und bei isolierten menschlichen Bronchien Kontraktionen auslösen konnten und können somit als pathophysiologisch relevant erachtet werden (4, 48). Dennoch war keine signifikante Minderung der Spermatozoenmotilität bei Patienten mit einer erhöhten Tryptasekonzentration (>10 ng/ml) in ihrem Seminalplasma erkennbar.

Derzeit ist es unklar, ob die im Seminalplasma enthaltene Tryptase im Hoden, Ductus deferens, Nebenhoden oder in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen produziert wird.



Weitere Experimente mit Ejakulaten, z.B. vasktomierter Patienten, und immun-histochemische Analysen könnten weitere Aufklärung liefern.

Im Rahmen dieser Untersuchung konnte keine Korrelation zwischen Tryptasekonzentrationen im Seminalplasma und Spermatozoenqualität bzw. Marker für Infektionen im Seminalplasma (Granulozytenelastase, Peroxidase-positive Leukozyten) festgestellt werden. Ebenfalls zeigte sich keine Assoziation von Tryptaseerhöhung im Seminalplasma und morphologischen Spermatozoenveränderungen. Im Gegensatz hierzu konnten Cincik et al. (12) eine statistisch signifikante Erhöhung von morphologisch veränderten Spermatozoen in mastzellhaltigen Ejakulaten feststellen.

Weiterführende Untersuchungen, z.B. bei Patienten mit unterschiedlichen Schweregraden und Ursachen ihrer Infertilität, könnten exaktere Erkenntnisse liefern.

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis tryptasehaltiger Mastzellen in der menschlichen Eileiterwand. Dies ergänzt Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (24, 41, 53, 50).

Hunt et al. (24) untersuchten Eileiter von 287 Frauen und konnten in 69% der Histologien intramuskulär lokalisierte Mastzellen auffinden.

Die Untersuchungen von Sandvei et al. (41) an gesunden Patientinnen (n = 33) zeigten eine signifikant höhere Mastzellzahl in der Lamina propria und der Muscularis externa in der Patientengruppe mit intrauteriner Antikonzeption (Pessar).

Ebenso konnten Tursi et al. (53) bei Untersuchungen an Patientinnen (n = 100), die intrauterine Antikonzeption (Pessar) einsetzen, eine im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 33) erhöhte Mastzellzahl im Endometrium feststellen.

Darüber hinaus wird eine Zyklusabhängigkeit der Mastzellzahl im Uterus diskutiert. Untersuchungen zeigten, dass sich prämenstruell die Anzahl uteriner Mastzellen erheblich reduziert und ihr Gehalt an metachromatischen Granula deutlich vermindert ist (50).

Die für unsere Untersuchungen verwendeten Gewebeproben wurden von Frauen gewonnen, die anamnestisch nicht an Fertilitätsstörungen oder Erkrankungen ihrer Genitale litten. Angaben über ihren Zyklus zum Zeitpunkt der Materialentnahme liegen aber nicht vor.

Obwohl in den Gewebeproben eindeutig tryptasehaltige Mastzellen nachweisbar waren, bleibt unklar, ob Tryptase, produziert von tubulären oder uterinen Mastzellen, wirklich die Lumina dieser Organe erreichen kann.

Es war bislang nicht bekannt, ob Tryptase im Zervikalmukus, dem Uterus oder in der Eileiterflüssigkeit vorhanden ist. Da es nicht möglich war, Tubenflüssigkeit zu untersuchen, wurde die Tryptasekonzentration in der Follikelflüssigkeit von Frauen bestimmt, die sich einer In-vitro-Fertilisation unterzogen.

Die Tryptasekonzentrationen lagen zwischen 1,60 und 3,73 ng/ml.

Allerdings müssen die hormonelle Behandlung und somit der unbekannte Effekt dieser Therapie auf die Tryptasewerte beachtet werden. Trotzdem zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass Mastzellen und Tryptase im weiblichen Genitaltrakt anzutreffen sind. Somit ist es wahrscheinlich, dass Spermatozoen während ihrer Wanderung durch den weiblichen Genitaltrakt mit Tryptase in Kontakt kommen.

Die Anwesenheit von Tryptase im Seminalplasma als auch in Follikelflüssigkeit und vermutlich in Tubenflüssigkeit lässt vermuten, dass Interaktionen zwischen Tryptase und Spermatozoen auf dem Weg zur Eizelle stattfinden.

Die hier vorliegenden Untersuchungen gewähren neue Einblicke in die Rolle von Mastzellprodukten und ihren Einfluss auf humane Spermatozoen. Tryptase als Protease in allen Mastzellen zeigt einen direkten, reversiblen und hemmenden Effekt auf die Motilität humaner Spermatozoen. Diese Effekte von Tryptase werden über PAR-2-Rezeptoren vermittelt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch auf humanen Spermatozoen nachgewiesen werden konnten.

Der Nachweis von tryptasehaltigen Mastzellen im menschlichen Eileiter und die Bestimmung von Tryptase in der Follikelflüssigkeit lässt vermuten, dass Spermatozoen während ihrer Migration durch den weiblichen Genitaltrakt mit Tryptase in Kontakt kommen. Somit wäre der Einsatz von Mastzellblockern auch bei Frauen eine mögliche Therapieoption, um motilitätshemmende Effekte von Mastzellproteasen auf Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt zu blockieren.

Die gewonnenen Resultate erweitern das Verständnis von Fertilitätsstörungen. Darüber hinaus unterstützen die vorliegenden Ergebnisse die bereits gewonnene Erkenntnis, dass der Einsatz von Medikamenten, welche die Mastzellfunktion und -degranulation beeinflussen, für Patienten mit Störungen ihrer Spermatogenese bzw. Fertilität von

Nutzen sein könnte, und eröffnen neue Ansatzpunkte für therapeutische Verfahren bei Fertilitätsstörungen von Mann und Frau.

## 5. Zusammenfassung

Bislang war nicht bekannt, ob und welche Funktionen Mastzellen und ihre Produkte, z.B. Tryptase und Chymase, bei Fertilitätsstörungen einnehmen.

Tryptase ist in allen menschlichen Mastzellen enthalten (MC<sub>T</sub>-Typ und MC<sub>TC</sub>-Typ) und kann proteinase-activated receptor 2 (PAR-2-Rezeptor) aktivieren. Chymase hingegen ist nur in einer bestimmten Mastzelluntergruppe (MC<sub>TC</sub>-Typ) enthalten.

Bei Patienten mit Fertilitätsstörungen wurde eine signifikant erhöhte Mastzellzahl im interstitiellen Bindegewebe ihrer Hoden und in der Lamina propria ihrer Tubuli seminiferi im Vergleich zu fertilen Patienten beobachtet. Verschiedene Studien berichteten über den erfolgreichen Einsatz von Mastzellblockern bei der Therapie männlicher Infertilität.

Nachdem bei einigen andrologischen Patienten signifikant erhöhte Tryptasespiegel im Seminalplasma detektiert werden konnten, war es von großem Interesse, ob Tryptase direkte Effekte auf menschliche Spermatozoen hat.

Es konnte gezeigt werden, dass die Gesamtmotilität der Spermatozoen nach einer Inkubation von 10 Minuten mit 1000 ng/ml Tryptase signifikant abnahm. Nach 30 und 60 Minuten konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Gesamtmotilität bei geringeren Tryptasekonzentrationen festgestellt werden. Dieser inhibitorische Effekt blieb während einer Beobachtungszeit von 180 Minuten bestehen.

Die Effekte von Tryptase auf Spermatozoen werden über PAR-2-Rezeptoren vermittelt. Es gelang, immunhistochemisch PAR-2-Rezeptoren in der akrosomalen Membran und im Mittelstück humaner Spermatozoen zu lokalisieren. Die Exposition humaner Spermatozoen von gesunden Spendern (n = 12) mit normalen Spermatozoenparametern mit menschlicher, rekombinanter Tryptase führte zu einer signifikanten Abnahme ihrer Beweglichkeit, die sowohl zeit- als auch dosisabhängig war. Darüber hinaus zeigte sich der inhibitorische Effekt von Tryptase als reversibel und konnte durch Präinkubation der Spermatozoen mit Anti-Tryptase-Antikörpern verhindert werden. Die PAR-2-Rezeptoren erwiesen sich als funktionell aktiv, da nach Präinkubation der Spermatozoen mit Anti-PAR-2-Antikörpern und anschließender Inkubation mit Tryptase der motilitätshemmende Effekt von Tryptase nicht eintrat.

Im Gegensatz hierzu war die verringerte Beweglichkeit der Spermatozoen nach Inkubation mit Chymase nicht reversibel, so dass dieser Effekt rein proteolytisch zu sein scheint.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass Mastzellprodukte sowohl einen rezeptor- als auch einen nicht-rezeptorvermittelten, inhibitorischen Effekt auf humane Spermatozoen ausüben. Tryptase konnte im Seminalplasma bestimmt werden, und es gelang der Nachweis tryptasehaltiger Mastzellen in der menschlichen Eileiterwand. Dies läßt vermuten, dass Effekte von Tryptase auf dem Weg der Spermatozoen zur Eizelle stattfinden könnten.

Somit könnten im weiblichen und männlichen Genitaltrakt lokalisierte Mastzellen und ihre Produkte eine bis jetzt unbekannte Rolle bei der menschlichen Fertilität bzw. Sterilität einnehmen, wodurch sich neue Ansätze bei der Therapie von Fertilitätsstörungen mit Mastzellblockern eröffnen.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Adams, J.C.; Watt, F.M.: Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes. *Nature* 1989; 340: 307 – 309
- (2) Artuc, M.; Hermes, B.; Steckelings, M.U.; Grutzkau, A.; Henz, B.M.: Mast cells and their mediators in wound healing-active: participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* 1999; 8: 1 – 16
- (3) Behrendt, H.; Hilscher, B.; Passia, D.; Hofmann, N.; Hilscher, W.: The occurrence of mast cells in the human testis. *Acta Anat* 1981; 111: 14
- (4) Berger, P.; Compton, S.J.; Molimard, M.; Walls, A.F.; N'Guyen, C.; Marthan, R.; Tunon-de-Lara, J.H.: Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 804 – 812
- (5) Biber, Franz Stephan: Stimulation kryokonservierter Spermatozoen mit Pentoxifyllin. Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, 2003
- (6) Böhm, S.K.; Khitin, L.M.; Grady, E.F.; Aponte, G; Payan, D.G.; Bunnett, N.W.: Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase – activated receptor – 2. *J Biol Chem* 1996; 271: 22003 – 22016
- (7) Böhm, S.K.; Kong, W.; Bromme, D.; Smeekens, S.P.; Anderson, D.C.; Conolly, A.; Kahn, M.; Nelken, N.A.; Coughlin, S.; Payan, D.G.; Bunnett, N.: Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor 2. *Biochemb J* 1996; 314: 1009 - 1016
- (8) Bradding, P.; Holgate, S.T.: Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 31: 119 - 133

- (9) Brain, S.D.; Williams, T.J.: Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin – gene – related peptide. *Nature* 1988; 335: 73 – 75
- (10) Briggemann, R.A.; Schechter, N.M.; Fräki, J.; Lazarus, G.S.: Degradation of the epidermal – dermal junction by proteolytic enzymes from human skin and human polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1984; 160: 1027 – 1042
- (11) Cayan, S.; Apa, D.D.; Akbay, E.: Effect of fexofenadine, a mast cell blocker, in infertile men with significantly increased testicular mast cells. *Asian J Androl* 2002; 12: 291 - 294
- (12) Cincik, M.; Sezen, C.S.: The mast cell in semen: their effects on sperm motility. *Arch Androl* 2003; 49: 307 - 311
- (13) Corvera, C.U.; Dery, O.; McConalogue, K.; Böhm, S.K.; Khitin, L.M.; Caughey, G.H.; Payan, D.G.; Bunnet, N.W.: Mast cell tryptase regulates colonic myocytes through proteinase-activated Receptor 2. *J Clin Invest* 1997; 100: 1383 - 1393
- (14) D`Andrea, M.R.; Derian, C.K.; Leturcq, D.; Baker, S.M.; Brunmark, A.; Lin, P.; Darrow, A.L.; Santulli, R.J.; Brass, L.F.; Andrade-Gordon, P.: Characterization of protease-activated receptor 2 immunoreactivity in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 157 - 164
- (15) Ehrlich, P.: Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbung und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch Mikr Anat* 1877; 13: 263
- (16) Ehrlich, P.: Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Inaug. Diss. Univ. Leipzig (1878). In: Himmelweit F(Ed): *Collected Papers of Paul Ehrlich*. Vol 1 pp. 65 - 98. Pergamon Press London / New York 1956
- (17) Fräki, J.E.: Human skin proteases: effect separated proteases on vascular permeability and leucocyte emigration in skin. *Acta Dermatol Venerol* 1977; 57: 393 - 398

- (18) Frungieri, M.B.; Weidinger, S.; Meineke, V.; Köhn, F.M.; Mayerhofer, A.: Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR-2, COX-2, prostaglandines and PPAR gamma: Possible relevance to human fibrotic disorders. *PNAS* 2002; 23: 15072 - 15077
- (19) Hashimoto, J.; Nagai, T.; Takaba, H.; Yamamoto, M.; Miyake, K.: Increased mast cells in the limiting membrane of seminiferous tubules in the testes of patients with idiopathic infertility. *Urol Int* 1988; 43: 129 – 132
- (20) Hawkey, C.J.: Cox-2 inhibitors. *Lancet* 1999; 353: 307 - 314
- (21) Hawkey, C.J.; Jones, J.I.: Gastrointestinal safety of COX-2 specific inhibitors. *Gastroenterol Clin North Am* 2001; 30: 937 - 952
- (22) Henz, J.L.; Maurer, M.; Lippert, U.; Worm, M.; Babina, M.: Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol* 2001; 10: 1 - 10
- (23) Hibi, H.; Kato, K.; Mitsui, K.; Taki, T.; Yamada, Y.; Honda, N.; Fukatsu, H.: The treatment with tranilast, a mast cell blocker, for idiopathic oligozoospermia. *Arch Androl* 2001; 47: 107 - 111
- (24) Hunt, J.L.; Lynn, A.A.: Histologic features of surgically removed fallopian tubes. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 951 - 955
- (25) Inoue, H.; Oshima, H.; Kono, H.; Yamanaka, M.; Kubota, T.; Aihara, M.; Hiroi, T.; Yago, N.; Ishida H.: Suppressive effects of tranilast on the expression of inducible cyclooxygenase (COX2) in interleukin-1 $\beta$ -stimulated fibroblasts. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1941 – 1944
- (26) Johnson, D.A.; Barton, G.J.: Mast cell tryptases: Examination of unusual characteristics by multiple sequence alignment and molecular modeling. *Protein Sci* 1992; 1: 370 - 377



- (27) Lohi, J.; Harvima, I.; Keski-Oja, J.: Pericellular substrates of human mast cell tryptase. *J Cell Biochem* 1992; 50: 337 - 349
- (28) Maseki, Y.; Miyake, K.; Mitsuya, H.; Kitamura, H.; Yamada, K.: Mastocytosis occurring in the testes from patients with idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 1981; 36: 814 – 819
- (29) Meineke, V.; Frungieri, M.; Jessberger, B.; Vogt, H.; Mayerhofer, A.: Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testis of infertile men. *Fertil Steril* 2000; 74: 239 - 244
- (30) Metcalfe, D.D.; Baram, D.; Mekori, Y.A.: Mast cells. *Physiological Reviews* 1999; 77: 1033 - 1079
- (31) Miller, J.S.; Moxley, G.; Schwartz, L.B.: Cloning and characterization of a second complementary DNA for human tryptase. *J Clin Invest* 1990; 86: 864 - 870
- (32) Mizutani, H.; Schechter, N.; Lazarus, G.; Black, R.A.; Kupper, T.S.: Rapid and specific onversion of precursor interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med* 1991; 174: 821 - 825
- (33) Molino, M.; Barnathan, E.S.; Numerof, R.; Clark, J.; Dreyer, M.; Cumashi, A.; Hoxie, J.A.; Schechter, N.; Wookalis, M.; Brass, L.F.: Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 1996; 272: 4043 - 4049
- (34) Nistal, M.; Santamaria, L.; Paniagua, R.: Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat* 1984; 119: 115 - 160
- (35) Nystedt, S.; Emilsson, K.; Wahlstedt, C.; Sundelin, J.: Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9208 - 9212

- (36) Nystedt, S.; Ramakrishan, V.; Sundelin, J.: The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 14910 – 14915
- (37) O'Brien, P.J.; Molino, M.; Kahn, M.; Brass, L.F.: Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene* 2001; 20: 1570 - 1581
- (38) Platt, M.S.; Yuninger, J.W.; Sekala-Perlman, A.; Irani, A.A.: Involvement of mast cells in sudden infant death syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 250 - 256
- (39) Renauld, J.C.: New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54: 577 – 589
- (40) Sakai, K.; Ren, S.; Schwartz, L.B.: A novel heparin – dependent processing pathway for human tryptase. Autocatalysis followed by activation with dipeptyl peptidase I. *J Clin Invest* 1996; 15: 988 – 995
- (41) Sandvei, R.; Wollen, A.R.; Flood, P.R.; Anker, C.: Mast cells in the tubular wall in women using intrauterine contraceptive device. *Br J Obstet Gynecol* 1986; 93: 758 - 764
- (42) Schill, W.B.; Schneider, J.; Ring, J.: The use of ketotifen, a mast cell blocker, for treatment of oligo- and asthenozoospermia. *Andrologia* 1986; 18: 570 - 573
- (43) Schwartz, L.B.: Mast cells: function and contents. *Curr Op Immunol* 1994; 6: 91 - 97
- (44) Schwartz, L.B.; Bradford, T.R.; Lee, D.C.; Chlebowski, J.F.: Immunologic and physiochemical evidence for conformational changes occurring on conversion of human mast cell tryptase from active tetramer to inactive monomer. production of monoclonal antibodies recognizing active tryptase. *J Immunol* 1990; 144: 2304 – 2311

- (45) Schwartz, L.B.; Bradford, T.R.; Littann, B.H.; Wintroub, B.U.: The fibrogenolytic activity of purified tryptase from human lung mast cells. *J Immunol* 1985; 135: 2762 – 2767
- (46) Schwartz, L.B.; Min, H.K.; Shunlin, R.; Xia, H.Z.; Hu, J.; Zhao, W.; Moxley, G.; Yoshihiro, F.: Tryptase precursors are preferentially and spontaneously released, whereas mature tryptase is retained by HMC-1-cells, mono-mac-6-cells, and human skin-derived mast cells. *J Immunol* 2003; 170: 5667 - 5673
- (47) Schwartz, L.B.; Yuninger, J.W.; Miller, J.S.; Bokhari, R.; Dull, D.: The time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989; 83: 1551 - 1555
- (48) Sekizawa, K.; Caughey, G.; Lazarus, S.C.; Gold, W.M.; Nadel, J.A.: Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs. *J Clin Invest* 1989; 83: 175 - 179
- (49) Shiota, N.; Okunishi, H.; Fukamizu, A.; Sakonjo, H.; Kikumori, M.; Nishimura, T.; Nakagawa, T., Murikami K., Miyazaki M.: Activation of two angiotensin-generating systems in the balloon-injured artery. *FEBS Lett* 1993; 323: 239 - 242
- (50) Sivridis, E.; Giatromanolaki, A.; Agnatis, N.; Anastasiadis, P.: Mast cell distribution and density in the normal uterus-metachromatic staining using lectins. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 98: 109 - 113
- (51) Tada, K.; Murikami, M.; Kambe, T.; Kudo, L.: Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A2 in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions. *J Immunol* 1998; 161: 5008 – 5015
- (52) Teemann, U.A.; Geba, G.P.; Rankin, J.A.; Flavell, R.A.: Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast

- cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998; 188: 1307 – 1320
- (53) Tursi, A.; Mastronilli, A.; Ribatti, D.; Loiudice, L.; Contino, R.; Claudatus, J.: Possible role of mast cells in the mechanism of action of intrauterine contraceptive device. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 1064 – 1066
- (54) Walls, A.F.; Brain, S.D.; Desai, A.; Jose, P.J.; Hawkings, E.; Church, M.K.; Williams, T.J.: Mast cell tryptase attenuates the vasodilator activity of calcitonin-gene-related peptide. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1243 - 1248
- (55) Welle, M.: Development, significance and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast-cell specific proteases chymase and tryptase. *J Leuc Biol* 1997; 61: 233 – 245
- (56) WHO, Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und Spermien-Zervikalschleiminteraktion. 4. Auflage, Berlin/Heidelberg/New York: Springer, 1999
- (57) Wills – Karp, M.; Luyimbazi, J.; Xu, X.; Schofield, B.; Neben, T.Y.; Karp, C.L.; Donaldson, D.D.: Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282: 2258 – 2261
- (58) Yamamoto, M.; Hibi, H.; Miyake, K.: New treatment of idiopathic severe oligospermia with mast cell blockers: results of a single blind study. *Fertil Steril* 1995; 64: 1221 - 1223
- (59) Yamanaka, K.; Fujisawa, M.; Tanaka, H.; Okada, H.; Arakawa, S.; Kamidono, J.: Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. *Hum Reprod* 2000; 15: 1543 - 1547
- (60) Yong, L.C.: The mast cell: origin, morphology, distribution and function. *Exp Toxicol Pathol* 1997; 49: 409 – 424

## 7. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. F.-M. Köhn möchte ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen bedanken.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. Stephan Weidinger für seine gute Betreuung, sowie seine Geduld.

Grossen Dank schulde ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des andrologischen Labors der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der TU München, besonders Frau Mechthild Bär, Frau Susanne Bogner und Frau Herta Sezer.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. A. Mayerhofer für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Anfertigung der histologischen Präparate.

Dank gebührt ebenfalls der gynäkologischen Gemeinschaftspraxis Drs. Bollmann/Brückner/ Noss.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Markus Falter für seine Unterstützung bedanken.

Schließlich möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring als Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie danken, in dessen Klinik diese Arbeit entstand, und der mir den Beginn meiner dermatologischen Ausbildung unter seiner Anleitung ermöglicht hat.

## 8. Lebenslauf

Name: Martin Benjamin Sbornik  
 Geburtsdatum: 05.03.1977 in Deggendorf  
 Familienstand: ledig  
 Eltern: Eleonora Sbornik, Internistin  
 Dr. med. Miroslav Sbornik, Internist

### Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Mietraching  
 1987 – 1996 Comenius – Gymnasium Deggendorf  
 1996 Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung

1996 – 1998 Universität Regensburg  
 Vorklinik

08/1998 Physikum

1998 – 2003 Technische Universität München  
 Klinisches Studium

03/2000 Erstes Staatsexamen

03/2002 Zweites Staatsexamen

2002 – 2003 Ausbildung Praktisches Jahr

1. Terial Dermatologie an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der TU München

2. Terial Chirurgie am Städt. Krankenhaus München / Bogenhausen

3. Terial Innere Medizin am Klinikum rechts der Isar, München

04/2003 Drittes Staatsexamen

Dissertation: 05/00 Beginn der Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der TU München  
 Betreuer: Dr. med. S. Weidinger

Arzt im Praktikum: 11/03 bis 10/04 an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der TU München

Assistenzarzt: seit 10/04 an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der TU München