

Aus der Hautklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Homey

Zur Bedeutung der Thermotaxis für die gerichtete Migration humaner Spermien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jumana Bus

(2015)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Homey

Zweitgutachter: Prof. Dr. Giessing

Zusammenfassung

Thermotaxis, eine gerichtete Bewegung entlang eines Temperaturgradienten, ist ein weit verbreiteter Prozess, der ubiquitär vom Bakterium bis zum Menschen konserviert ist. Mittels videomikroskopischer Analysen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Thermotaxis humaner Spermien nachgewiesen. Spermien, die in einer modifizierten Zigmond-Kammer einem Temperaturgradienten von 34 °C bis 37 °C ausgesetzt wurden, zeigten ein gerichtetes Migrationsverhalten in Richtung des Temperaturgradienten. Es ließ sich eine signifikante Zunahme der Wanderungstrecke der Spermien unter Einfluss des Temperaturgradienten beobachten. Zur Untersuchung der molekularen und zellulären Mechanismen dieser thermotaktischen Antwort analysierten wir die Expression von *Transient Receptor Potentials* (TRPs) auf humanen Spermien. Bei Eukaryonten fungieren temperaturgesteuerte Ionenkanäle der Superfamilie der TRPs als Thermosensoren. Die Analyse der Genexpression von TRP der Unterfamilie der Vanilloid-Rezeptoren (TRPV) auf humanen Spermien mittels quantitativer Real-Time-PCR zeigte die stärkste Expression von TRPV1, gefolgt von TRPV4, TRPV2 und TRPV3. Mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbungen wurde nachgewiesen, dass TRPV1, TRPV3 und TRPV4 auf Proteinebene auf Spermien exprimiert werden. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen lokalisierten wir die Rezeptoren im Bereich des Mittelstücks und des Schwanzes der Spermien. Bei allen Probanden dominierte die Expression von TRPV1, gefolgt von TRPV4, wobei sich eine donorabhängige Variabilität in der Ausprägung der Expression der einzelnen TRPV-Subtypen aufweisen ließ. Bei der Analyse zur funktionellen Bedeutung der TRPVs für die humane Spermienthermotaxis konnten wir eine signifikante konzentrationsabhängige Abschwächung der migratorischen Antwort humaner Spermien in An- und Abwesenheit des unselektiven TRPV-Inhibitors Rutheniumrot zeigen.

Zusammenfassend konnte durch die vorliegende Arbeit erstmals humane Spermienthermotaxis in einem videomikroskopischen Migrationsassay gezeigt werden. Erste Untersuchungen mit einem unselektiven TRPV-Inhibitor lassen vermuten, dass TRPV tatsächlich eine Rolle bei der Navigation von Spermien zur Eizelle und folglich für den gesamten Prozess der Befruchtung spielen könnten.

Abkürzungen

A	
A	Absorption
Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
Ad	<i>Adjusted</i> (s. angeglichen)
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
ART	Assistierte Reproduktions-Techniken
ATP	Adenosintriphosphat
B	
BEC	<i>Blood endothelial cells</i> (s. humane dermale mikrovaskuläre Blutendothelzellen)
BCTC	N-(4-tert-Butylphenyl)-4-(3-Chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazin-1(2H)-carboxamid
C	
Ca	<i>Carcinoma</i> (s. Karzinom)
Ca ²⁺	Zweiwertiges Kalzium
CaCo	Zelllinie von humanem Adenokarzinom des Kolons
cAMP	<i>Cyclic AMP</i> (s. Zyklisches Adenosinmonophosphat)
CatSper	<i>Cationic Channel of Sperm</i> (s. kationischer Spermienkanal)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> (s. Komplementäre DNS)
cGMP	<i>Cyclic GMP</i> (s. zyklisches Guanosinmonophosphat)
cGRP	<i>Calcitonin-gene-related-peptide</i>

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct-Wert	<i>Threshold cycle</i> (s. Schwellenwert-Zyklus)
D	
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	Das heißt
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DHEAS	Dehydroepiandrosterdion
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	<i>Desoxy-Ribonucleic-Acid</i> (s. DNA)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> (s. Desoxyribonukleotid-Triphosphat)
DTT	Dithiothreitol
E	
EET	Epoxyeicosatriensäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (s. und andere)
F	
Fab	<i>Antigen-binding fragment</i> (s. antigenbindendes Fragment)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> (s. Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (s. fötales Kälberserum)
FGM	<i>Fibroblast growth medium</i> (s.

	Wachstumsmedium für Fibroblasten)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	<i>Forward scatter</i> (s. Vorwärtsstreulicht)
G	
G	Gramm
H	
H	Stunde
HaCaT	Zelllinie von humanen immortalisierten Keratinozyten
HeLa	Humane immortalisierte Zervixkarzinom-Zelllinie von Henrietta Lacks
Hek	Human embryonal kidney (s. humanes embryonales Nierenzellepithel)
Hep G2ISO	Hepatozyten
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraenoidsäure
I	
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor</i> (s. Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor)
IgG	Immunglobulin G
iCGRP	<i>Immunreactive calcitonin gene related peptide</i> (s. immunreaktives Calcitonin-Gen-assoziiertes Peptid)
IP ₃	1,4,5-Triphosphat
IVF	<i>In-vitro</i> Fertilisation
K	
K ⁺	Kalium

KCl	Kaliumchlorid
Kera-SFM	Serumfreies Keratinozyten-Medium
Kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L	
La ³⁺	Dreiwertiges Lanthan
LH	Luteotropes Hormon
M	
m ²	Quadratmeter
mM	Millimolar
MEM	Modifiziertes Eagle Medium
Mg	Milligramm
Min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mRNA	<i>Messenger-RNA</i> (s. Boten-RNA)
N	
Na ⁺	Einwertiges Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NEAS	Nicht-Essentielle Aminosäuren
Nm	Nanometer
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
[(NH ₃) ₅ RuORu(NH ₃) ₄ ORu(NH ₃) ₅]Cl ₆	Rutheniumrot
NOMPC	<i>No mechanoreceptor potential C</i> (s. Nicht-Mechanorezeptor-Potenzial C)
O	

osm-9	<i>Osmotic avoidance abnormal</i> (s. osmotisch abnormale Vermeidungsreaktion)
Oligo dT	<i>Oligodeoxythymidylic acid</i> (s. Oligodeoxythymid-Säure)
P	
P	Permeabilitätsratio
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (s. phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (s. Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (s. Polymerasekettenreaktion)
PDD	Phorboldidecanoat
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
P-Wert	<i>Probability</i> (s. Wahrscheinlichkeit)
Q	
qPCR	Quantitative PCR
R	
R	Rot
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (s. RNA)
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	<i>Rotations per minute</i> (s. Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

RT-Buffer	<i>Reverse transcription buffer</i> (s. Reverse Transkriptions-Puffer)
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RU	<i>Relative units</i> (s. relative Einheiten)
S	
S	Sekunde
S	Schwarz
s.	Siehe
s.o.	Siehe oben
SOCs	<i>Store-operated Ca²⁺-Channels</i> (s. Speicherabhängige Kalzium-Kanäle)
SSC	<i>Side scatter</i> (s. Seitwärtsstreulicht)
T	
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	TRP-ANKTM
TRPC	TRP-Classic
TRPM	TRP-Melastatin
TRPML	TRP-Mucolipin
TRPN	TRP-NOMPC
TRPP	TRP-Polycystin
TRPV	TRP-Vanilloid
U	
u.a.	Unter anderem
Z	
z.B.	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Spermientransport im weiblichen Genitaltrakt.....	1
1.2	Die Superfamilie der <i>Transient Receptor Potentials</i>.....	5
1.2.1	Aufbau	5
1.2.2	Herkunft.....	6
1.2.3	Funktion	6
1.2.4	Vorkommen von TRP auf humanen Spermien	7
1.3	TRPV.....	7
1.3.1	Expressionsmuster der TRPV.....	8
1.3.2	Temperaturbereich.....	9
1.3.3	Rezeptoraktivierung	9
1.3.4	Rezeptorinhibition	11
1.4	Rutheniumrot.....	13
2	Ziel der Arbeit.....	15
3	Material und Methoden.....	16
3.1	Reagenzien	16
3.2	Zellkultur	17
3.3	Thermotaxis-Assay	18
3.3.1	Ejakulate	18
3.3.2	Spermienbehandlung	18

3.3.2.1	Swim-up	18
3.3.2.2	Auszählung und Verdünnung der Spermienzellzahl	18
3.3.3	Migrationsassay	19
3.3.3.1	Aufbau	19
3.3.3.2	Erstellung eines Temperaturgradienten	21
3.3.3.3	Migrationsversuch ohne Temperaturgradient	21
3.3.3.4	Zusatz eines Inhibitors	21
3.3.4	Bearbeitung des Filmmaterials.....	21
3.3.4.1	Verschlüsselung.....	21
3.3.4.2	Schneiden der Filmsequenzen.....	22
3.3.4.3	Migrationsanalyse	22
3.4	Spermien-Zytospin.....	23
3.5	Immunfluoreszenz-Färbung	23
3.6	Durchflusszytometrische Analyse.....	24
3.7	RNA-Isolierung und Reverse-Transkriptions- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	25
3.7.1	RNA-Extraktion	26
3.7.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	26
3.8	Quantitative PCR (qPCR)-Analyse.....	27
3.8.1	cDNA-Synthese.....	27
3.8.2	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	28
3.9	Computer-basierte quantitative Auswertungen	31
3.9.1	Migrationsstrecke der Spermien	32
3.9.2	Migration in Richtung des Gradienten.....	33
3.9.3	Gerichtete Migration in Richtung des Gradienten	33
3.9.4	Signifikanz.....	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Migrationsverhalten von Spermien unter Einfluss eines Temperaturgradienten	35

4.2	Analyse der Migrationsstrecke	43
4.3	Analyse der ungerichteten Migration	45
4.4	Analyse der gerichteten Migration	47
4.5	TRPV-Genexpressionsprofil.....	49
4.6	TRPV-Proteinexpressionsprofil	51
4.6.1	Durchflusszytometrische Analyse	51
4.6.2	Immunfluoreszenzanalyse	53
5	Diskussion.....	55
6	Literatur	73
7	Danksagung	
8	Eidesstattliche Versicherung	

1 Einleitung

1.1 Spermientransport im weiblichen Genitaltrakt

Seit vielen Jahren werden die molekularen Mechanismen, die für das Migrationsverhalten zwischen Spermien und Eizelle verantwortlich sind, untersucht. Die Passage durch den weiblichen Genitaltrakt ist vielseitig reguliert und dient dazu, die Chance zur Fertilisation so zu optimieren, dass sich nur Spermien mit normaler Morphologie und Motilität durchsetzen.

Während des Koitus werden ca. 250-500 Mio. Spermien (Gilbert 2000) ejakuliert. Allerdings erreicht schließlich nur eine kleine Fraktion von 80-1400 Spermien (0,004 %) (Williams, Hill et al. 1993) den Ort der Befruchtung im weiblichen Eileiter. Die Befruchtung der Eizelle gelingt in der Regel nur einem einzigen Spermium (De Jonge 2005, Suarez and Pacey 2006). Diese Reduktion der Spermienanzahl ist mit zahlreichen Mechanismen zur Optimierung der Fertilisationsbedingungen verbunden. Sie wird sowohl durch anatomische Barrieren als auch durch Veränderungen des Spermienmilieus bestimmt (Cohen-Dayag, Tur-Kaspa et al. 1995, Suarez and Pacey 2006).

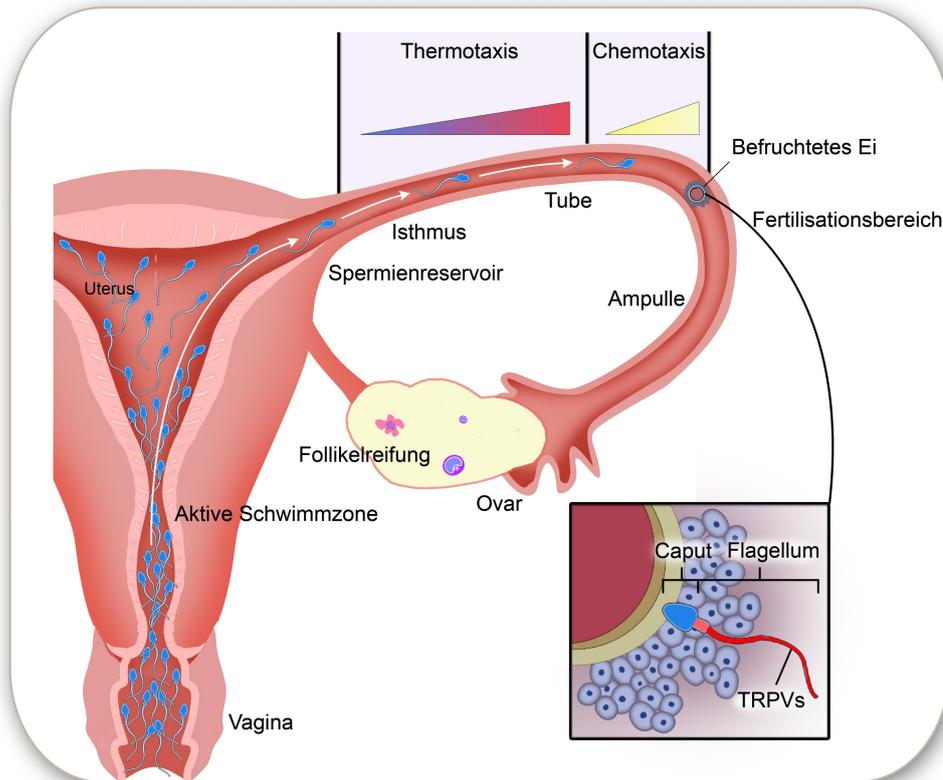


Abbildung 1 Migration eines Spermiums durch den weiblichen Genitaltrakt in Richtung der Eizelle. Die Spermienmigration erfolgt durch die Vagina in das *Cavum uteri* vor allem durch aktive Schwimmbewegungen der Spermien unterstützt durch Kontraktionen von Vagina bzw. Uterus. Ab dem Junctionsbereich zur Tube bestimmen dann auch andere Mechanismen wie z.B. Chemotaxis und Thermotaxis das Schwimmverhalten. Die Thermotaxis wird hierbei als Hauptnavigationsmechanismus für die Strecke vom Uterusisthmus (Spermenreservoir) bis in die *Tuba uterina* propagiert. In der unmittelbaren Nähe der Oozyte navigieren die Spermien dann bevorzugt durch Chemotaxis (modifiziert nach Eisenbach & Giojalas 2006).

Während des Koitus werden Spermien im Seminalplasma in der Vagina ejakuliert. Das entstandene Koagulat hält die Spermien am Eingang des Zervikalkanals (Harper 1994) und schützt sie vor dem sauren Milieu der Vagina (Lundwall, Giwercman et al. 2003). Zervikaler Mucus begünstigt einerseits die Passage motiler Spermien durch den Zervikalkanal (Mortimer and Swan 1995), andererseits ist er für die Migration morphologisch abnormaler Spermien hinderlich (Hanson and Overstreet 1981, Barros, Vigil et al. 1984, Katz, Morales et al. 1990, Katz, Slade et al. 1997). Zusätzlich zu ihrer Eigenbewegung werden die Spermien durch uterine Peristaltik (Lyons, Taylor et al. 1991, Fukuda and Fukuda 1994, Kunz, Beil et al. 1996) und hormonellen Einfluss aus dem dominanten Follikel durch das *Cavum uteri* (siehe Abbildung 1) zur ipsilateralen

Tube geleitet (Kunz, Herbertz et al. 1998, Kunz, Beil et al. 2007). Die nächste Barriere stellt der Übergang zwischen Uterus und Tube dar (Suarez and Pacey 2006). Der Junktionsbereich weist neben einer dicken Muskelschicht (Hafez 1969) viskösen Mucus auf, dessen Proteine die Passage der Spermien fördern (Jansen 1980, Nakanishi, Isotani et al. 2004). Einige Oberflächenproteine auf Spermien sind für bestimmte Bindungsprozesse im Junktionsbereich erforderlich (Suarez and Pacey 2006). Durch *in vitro* Experimente wurde nachgewiesen, dass Mäuse, denen bestimmte Proteine auf der Spermienoberfläche wie z.B. *Fertilin-β* (Cho, Bunch et al. 1998), das *Angiotensin Converting Enzyme (ACE)* (Hagaman, Moyer et al. 1998) oder *Calmegin* (Nakanishi, Isotani et al. 2004) fehlen, infertil sind, da sie den Junktionsbereich nicht passieren können (Suarez and Pacey 2006). Durch *in vitro* Experimente wurde nachgewiesen, dass Spermien im darauffolgenden Isthmus der Tube durch intermittierende Bindung an das Tubenepithel ein funktionelles Reservoir bilden (Pacey, Davies et al. 1995, Pacey, Hill et al. 1995, Baillie, Pacey et al. 1997, Reeve, Ledger et al. 2003). Die epitheliale Interaktion verlängert die Spermienpersistenz in der *Tuba uterina*, sodass nur eine geringe Anzahl der Spermien zu einer Zeit die Ampulle erreicht.

Während die Spermien durch den weiblichen Genitaltrakt wandern, durchlaufen sie die Kapazitation. Dieser Prozess ist die Voraussetzung für die Fertilisation (Yanagimachi 1994) und beinhaltet verschiedene Veränderungen in der Plasmamembran, die den Spermien die Fähigkeit verleihen, die Akrosomenreaktion zu induzieren (De Jonge 2005). Als Konsequenz der Kapazitation ergibt sich die Hyperaktivität, eine Veränderung in der Spermienmotilität. Sie verleiht den Spermien eine höhere Schwimmkraft und führt dadurch zu ihrer Ablösung vom Tubenepithel (Ho and Suarez 2001, Suarez and Ho 2003, Suarez and Ho 2003). Die Strecke, die Spermien zwischen Reservoir- und Fertilisationsbereich zurücklegen müssen, ist ca. 3-5 cm lang (Harper 1982, Tur-Kaspa 1992). Deshalb geht man davon aus, dass Spermien durch verschiedene gerichtete Mechanismen in die Ampulle geleitet werden.

Thermotaxis, als migratorische Antwort auf einen Temperaturgradienten, scheint für die Wanderung der Spermien über lange Strecken verantwortlich zu sein (Bahat and Eisenbach 2006) (Abbildung 1). Auf kurzer Strecke, in direkter

Nähe zur Eizelle werden Spermien dann durch den Prozess der Chemotaxis gelenkt (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003). Geleitet durch Thermotaxis schwimmen die Spermien also von der kälteren Isthmus-Seite zum wärmeren ampullären Bereich, wo die Fertilisation stattfindet (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003). Während in einigen Organismen oder Zellpopulationen Thermotaxis in beide Richtungen von Temperaturgradienten funktioniert (Hedgecock and Russell 1975, Maeda, Imae et al. 1976, Whitaker and Poff 1980), wirkt sie bei Spermien in Richtung des positiven Gradienten: hier ist die wärmere Seite wegweisend (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003). Temperaturunterschiede von bis zu 0,5 °C werden erkannt. Jedoch sind, wie auch bei der Chemotaxis (Cohen-Dayag, Ralt et al. 1994, Cohen-Dayag, Tur-Kaspa et al. 1995, Fabro, Rovasio et al. 2002), nur kapazitierte Spermien thermosensibel (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003).

Thermotaxis ist ein stark konservierter Prozess und wurde erstmalig im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* beschrieben (Raper 1940, Bonner, Clarke et al. 1950), danach in dem Nematoden *C. elegans* (Hedgecock and Russell 1975), in Bakterien (Maeda, Imae et al. 1976), in Parasiten wie z.B. *Dirofilaria immitis* larvae (Mok, Abraham et al. 1986), in Insekten wie z.B. *Drosophila melanogaster* (Sayeed and Benzer 1996), in humanen Leukozyten (Kessler, Jarvik et al. 1979, Mizuno, Kawasaki et al. 1992), in humanen Trophoblasten (Higazi, Kniss et al. 1996), in humanen Kaninchenspermien (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003, Bahat, Eisenbach et al. 2005) und schliesslich auch in menschlichen Spermien (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003).

Bei Kaninchen besteht zwischen Isthmus und Ampullenbereich ein Temperaturunterschied von bis zu 2 °C (David, Vilensky et al. 1971). Er scheint vom Zeitpunkt der Ovulation abhängig zu sein, da er mit der Ovulation von 0,8 +/- 0,2 °C auf 1,6 +/- 0,1 °C ansteigt (Bahat, Eisenbach et al. 2005). Diese Differenz basiert auf einem Temperaturabfall auf der Seite des funktionellen Spermienreservoirs im Isthmusbereich (Bahat, Eisenbach et al. 2005). Eine Arbeitsgruppe um Cicinelli (Cicinelli, Einer-Jensen et al. 2004) entdeckte eine ähnliche ovulationsabhängige Temperaturdifferenz beim Menschen. Sie konnte zeigen, dass hier die Temperatur von der Isthmusregion in Richtung des Uterus bei der Ovulation abfällt (Cicinelli, Einer-Jensen et al. 2004).

1.2 Die Superfamilie der *Transient Receptor Potentials*

Relevante Studien zur Thermotaxis von Bakterien haben gezeigt, dass temperaturgesteuerte Ionenkanäle, die zur Superfamilie der *Transient Receptor Potentials* (TRPs) gehören, bei Eukaryonten als Thermosensoren fungieren (Patapoutian, Peier et al. 2003).

1.2.1 Aufbau

Die TRP-Kanäle werden auf der Basis ihrer Aminosäurehomologie in die folgenden sieben Unterfamilien gegliedert (Montell, Birnbaumer et al. 2002, Montell, Birnbaumer et al. 2002, Moran, Xu et al. 2004). Sie zeigen ihre Gemeinsamkeit in einem Ionenkanal bestehend aus sechs Transmembranregionen (Venkatachalam and Montell 2007), der nur für Kationen durchlässig ist:

1. TRPC: klassische Unterfamilie
2. TRPV: Vanilloid-Rezeptor Unterfamilie
3. TRPM: Melastatin Unterfamilie
4. TRPN: NOMPC (engl. *No mechanoreceptor potential C*)-Unterfamilie
5. TRPA: ANKTM1 Unterfamilie
6. TRPML: Mucolipin Unterfamilie
7. TRPP: Polycystin Unterfamilie

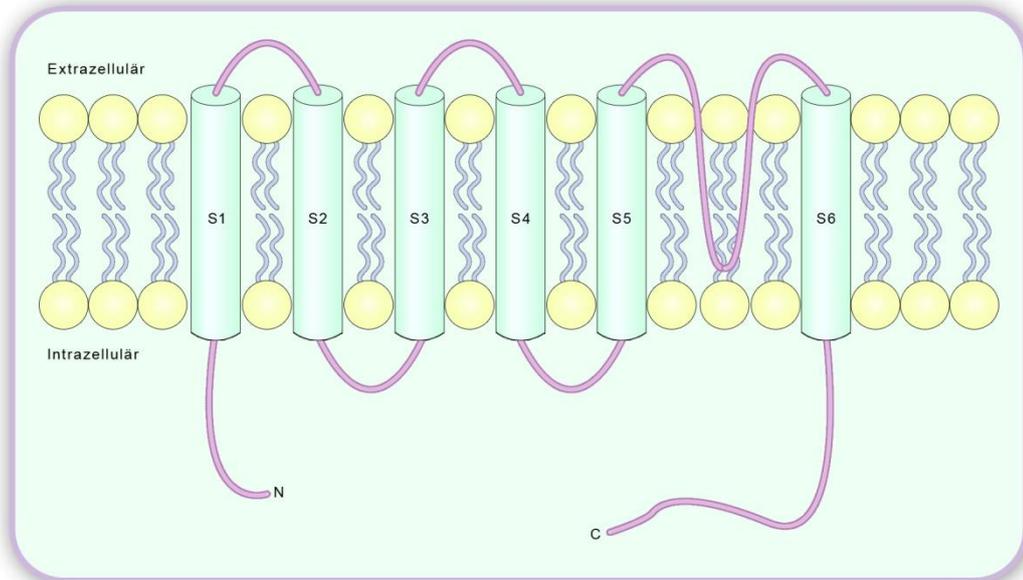


Abbildung 2 Schematischer Aufbau eines TRPV-Kanals. Der TRPV-Kanal gehört zur Superfamilie der TRP-Kanäle, den *Transient Receptor Potentials*. Die TRP-Vanilloidkanäle bestehen aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6), die sowohl als Homotetramer als auch in Form von Heterotetrameren vorkommen. TRPVs sind permeabel für Kationen wie z.B. Ca^{2+} und besitzen zwischen ihrem Transmembransegment fünf und sechs eine Porenschleife über einer hydrophoben Region. Die N- und C-terminalen Enden sind intrazellulär, wobei sich am N-terminalen Ende eine Anzahl von Ankyrin-Domänen befindet (modifiziert nach ClaphamRunnels & Strubing 2001).

1.2.2 Herkunft

Phylogenetisch sind die Rezeptoren sehr alt und hoch konserviert. Sie wurden erstmals 1969 bei einer mutierten Linie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo sie als Photorezeptoren auf Lichtreize und Depolarisation mit einem TRP vermittelten transienten Membranstrom reagierten (Xiao and Xu 2009). Nach der Klonierung des Gens durch die Arbeitsgruppe um Montell und Rubin konnte gezeigt werden, dass das Gen *Osm-9* (engl. *osmotic avoidance abnormal*) bei *Drosophila* für einen Kalzium durchlässigen Kationenkanal kodiert (Montell and Rubin 1989, Montell 2001).

1.2.3 Funktion

Die meisten TRP-Kanäle sind Kalzium durchlässig und führen zu einem Kalziumioneneinstrom wie bei TRPC, TRPV und TRPM (Nilius and Voets

2005). Die Kanäle werden durch die Bindung an einen intrazellulären oder extrazellulären Botenstoff oder durch chemischen, mechanischen und osmotischen Stress aktiviert (Clapham 2003). In Pantoffeltierchen (*Paramecium*), sowie auch in humanen dopaminergen Neuronen, stellen die TRP-Kanäle z.B. hitzeaktivierte Kalziumkanäle (Imada and Oosawa 1999, Guatteo, Chung et al. 2005) dar. In diesem Zusammenhang spielen sie beim Menschen eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von Geschmack, Pheromonen, Schmerz und Temperatur (Venkatachalam and Montell 2007). Welche Unterfamilie als Thermosensor im Rahmen der beschriebenen Thermotaxis bei humanen Spermien dient, ist bisher noch nicht ausreichend untersucht.

1.2.4 Vorkommen von TRP auf humanen Spermien

Auf humanen Spermien wurden TRPC1, TRPC3, TRPC6 und TRPC7 nachgewiesen. Sie sind im Bereich des Caputs und Flagellums lokalisiert und haben einen Einfluss auf die flagellare Motilität der Spermien (Castellano, Trevino et al. 2003). Es sind zwei TRP-Subklassen bekannt, die über Temperatur aktiviert werden. Einerseits die TRPVs, die über Wärme aktiviert werden (Montell 2005), andererseits TRPM8 (Peier, Moqrich et al. 2002, Tominaga and Caterina 2004, Mizushima, Obata et al. 2006), der u.a. durch Kälte stimuliert wird.

1.3 TRPV

Neben den bereits erwähnten TRPC und TRPM8, sind die Vertreter der Unterfamilie TRPV in Bezug auf Thermoempfindlichkeit von molekularbiologischem Interesse (Patapoutian 2004, Patapoutian 2005). Die temperatursensitiven Vanilloid-Rezeptoren bestehen aus sechs Mitgliedern, zu denen die Kalzium-permeablen TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4, sowie TRPV5 und TRPV6 gehören (den Dekker, Hoenderop et al. , Nijenhuis, Hoenderop et al. 2003, Nijenhuis, Hoenderop et al. 2003). TRPV1-4 sind nicht-selektive Kationenkanäle mit einer niedrigen Permeabilitätsratio (P) für Kalzium (Ca^{2+}) im Verhältnis zu Natrium (Na^+) ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 10$) (Clapham 2003, Alexander, Mathie et al. 2004). Im Gegensatz dazu sind TRPV5 und TRPV6 die einzigen

hochselektiven Kalziumkanäle mit einer Permeabilitätsratio > 100 (Nilius and Voets 2005). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Kalziumreabsorption (Nijenhuis, Hoenderop et al. 2003), wobei TRPV5 überwiegend in der Niere (Nijenhuis, Hoenderop et al. 2003) und TRPV6 vorwiegend im Dünndarm (Nijenhuis, Hoenderop et al. 2005) funktionell aktiv sind.

1.3.1 Expressionsmuster der TRPV

Die TRPV unterscheiden sich im Ort ihrer Expression und ihrer jeweiligen Funktion (siehe Tab. 1):

Zuerst wurde TRPV1 in Rückenmarksganglien und dem Ganglion des *Nervus trigeminus* identifiziert, sowie auf peripheren, spinalen Nervenendigungen und im Gehirn (Planells-Cases, Garcia-Sanz et al. 2005). Dort hat TRPV1 eine wichtige Funktion bei der Integration von schmerzhaften chemischen und thermischen Stimuli (Caterina, Leffler et al. 2000). Eine Reihe von Studien konnten überdies zeigen, dass TRPV1 auch in vielen nicht-neuronalen Geweben wie Harnblase, Urothel, Ösophagus, Magen, Darm, Lunge, Niere, Milz, Mastzellen, neutrophilen Granulozyten und Keratinozyten exprimiert wird (Birder, Kanai et al. 2001, Gunthorpe, Benham et al. 2002, Heiner, Eisfeld et al. 2003, Matthews, Aziz et al. 2004, Stander, Moormann et al. 2004, Stokes, Wakano et al. 2005). Außerdem konnte der TRPV1-Rezeptor in Pankreaszellen nachgewiesen werden, wo er im Zusammenhang mit der Sekretion des Neuropeptids Substanz P steht (Nathan, Patel et al. 2001). Auch in peripheren Blutzellen sind TRPV1 und TRPV2 beschrieben und werden mit entzündungs-induzierter thermaler Hyperalgesie assoziiert (Saunders, Kunde et al. 2007).

TRPV2 wird ebenso wie TRPV1, TRPV3 und TRPV4 in freien Nervenendigungen und Rückenmarksganglien exprimiert, jedoch auch in anderen Geweben wie Gehirn, Lunge, Milz, Endothelzellen, nicht-neuronalen Zellen des Gastrointestinaltraktes (Gunthorpe, Benham et al. 2002, O'Neil and Heller 2005), Osteoblasten (Abed, Labelle et al. 2009) und glatter Muskulatur (Montell, Birnbaumer et al. 2002, Muraki, Iwata et al. 2003, Beech, Muraki et al. 2004). In den glatten Muskelzellen von Gefäßen vermittelt TRPV2, aktiviert durch Dehnungsreize, die intrazelluläre Kalziumfreisetzung (Muraki, Iwata et al. 2003, Beech, Muraki et al. 2004).

TRPV3 ist unter anderem in Keratinozyten (Peier, Reeve et al. 2002) und verschiedenen Geweben wie Zunge, Trachea, Plazenta, Gehirn (O'Neil and Heller 2005) und Hoden vorhanden (Smith, Gunthorpe et al. 2002, Moqrich, Hwang et al. 2005).

Neben der Expression von TRPV4 in Rückenmarksganglien, Gehirn und Keratinozyten, wurde der Rezeptor auch in der Niere, Trachea, Herz, Leber, Haarzellen der Cochlea, Merkelzellen, Endothelzellen, Osteoblasten und glatten Muskelzellen beschrieben, wo er u.a. als Mechanosensor dient (O'Neil, Gao et al. 2005, O'Neil and Heller 2005, Abed, Labelle et al. 2009).

1.3.2 Temperaturbereich

TRPV1-4 können durch Temperatur aktiviert werden, reagieren jedoch in unterschiedlichen Bereichen (s. Tab. 1). TRPV1 reagiert auf Temperaturen $> 43\text{ °C}$, TRPV2 in einem Temperaturbereich $> 53\text{ °C}$, TRPV3 in Wärmebereichen $> 33\text{ °C}$ und TRPV4 bei $> 24\text{ °C}$ (Lee and Caterina 2005, Nilius and Voets 2005). Während TRPV3 auf wiederholte Thermoreize mit einer verstärkten Reizantwort reagiert und ein kinetisch biphasisches Aktionsprofil aufweist (Chung, Guler et al. 2005), führt prolongierte Wärmeexposition $> 24\text{ °C}$ zu einer Reduktion der durch Hitze evozierten Ströme (Peier, Reeve et al. 2002, Smith, Gunthorpe et al. 2002, Xu, Ramsey et al. 2002). Die Rezeptoraktivierung durch Wärme beruht auf spannungsabhängiger Depolarisation (Caterina and Julius 2001, Chung, Lee et al. 2004, Voets, Droogmans et al. 2004, Nilius and Voets 2005). Bei TRPV1 bewirken Protonen, Aktivierung durch die Proteinkinase C (PKC) und die Abnahme der intrazellulären Phosphatidylinositol-Konzentration eine Reduktion der Temperaturgrenze (Prescott and Julius 2003, Pedersen, Owsianik et al. 2005).

1.3.3 Rezeptoraktivierung

Neben Wärme werden die Vanilloid-Rezeptoren auch durch andere Stimuli (Tab. 1) wie z.B. durch 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), welches auf TRPV1-3 wirkt (Hu, Gu et al. 2004), aktiviert. Ihre Aktivität ist G-Protein gekoppelt (Xu, Delling et al. 2006) und wird außerdem durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren beeinflusst (Kahn-Kirby and Bargmann 2006). Die

Vanilloid-Komponenten Capsaicin, Resiniferatoxin und Olvanil, ein niedriger pH-Wert < 5,9 der Cannabinoid-Rezeptorligand Anandamid, die Eikanoside 12-(S)-Hydroperoxyeicosatetraenoidsäure (HPETE), 15-(S)-HPETE, 5-(S)-HPETE, Leukotrien B₄, der *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) (s. Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor) und endogene Lipide (Endovanilloide) stellen andere relevante Stimuli von TRPV1 dar (Montell, Birnbaumer et al. 2002, Montell, Birnbaumer et al. 2002, Planells-Cases, Garcia-Sanz et al. 2005, Kochukov, McNearney et al. 2006, Bahat and Eisenbach 2009).

TRPV2, welcher in 50 % seiner Sequenzen mit TRPV1 identisch ist (Caterina, Rosen et al. 1999), reagiert auf Neuropeptide und wird durch den Wachstumsfaktor IGF-1 zur Zellmembran transportiert, wo er in seinen aktiven Funktionszustand gelangt (Kanzaki, Zhang et al. 1999, Iwata, Katanosaka et al. 2003). Außerdem spielt dieser Vanilloid-Rezeptor eine wichtige Rolle als Mechanosensor, indem er bei Dehnungsreizen und osmotischer Zellschwellung in glatten Muskelzellen einen intrazellulären Kalziumanstieg vermittelt (Muraki, Iwata et al. 2003, Beech, Muraki et al. 2004).

Ein spezifischer Aktivator für TRPV3 ist Kampfer, eine in der Natur vorkommende Substanz, die das Wärmeempfinden der Haut verstärkt und in topischen Analgetika verwendet wird (Moqrich, Hwang et al. 2005). Weitere Stimuli von TRPV3 sind diphenylhaltige Wirkstoffe (Chung, Lee et al. 2004, Hu, Gu et al. 2004, Chung, Guler et al. 2005).

TRPV4 ist konstitutiv bei normaler Körpertemperatur von ca. 37 °C geöffnet und reagiert überdies auch auf Faktoren wie Zellschwellung, Scherkräfte, Fettsäureamide, Anandamid, 4 α -Phorbol-12,13-didecanoat (4 α -PDD) und den Cytochrom P450-abhängigen Metaboliten von Arachidonsäure Epoxyeicosatriensäure (EET) (Watanabe, Davis et al. 2002, Nilius, Watanabe et al. 2003, Watanabe, Vriens et al. 2003, Nilius, Vriens et al. 2004, Vriens, Watanabe et al. 2004, Saghatelian, McKinney et al. 2006). Der Rezeptor hat dabei vielseitige Aufgaben und fungiert nicht nur als Thermo-, Mechano- und Osmosensor, sondern reguliert auch die Kalzium-Homöostase (O'Neil and Heller 2005).

Kalziumabhängig sind auch TRPV5 und TRPV6. Ein geringer intrazellulärer Kalziumspiegel sowie Hyperpolarisation führen zu ihrer Aktivierung. Unter physiologischen Bedingungen sind sie für Kalzium permeabel, können aber

auch für monovalente Kationen durchlässig sein (Vennekens, Hoenderop et al. 2000, Nilius, Prenen et al. 2001, Nilius, Vennekens et al. 2001, Vennekens, Droogmans et al. 2001).

1.3.4 **Rezeptorinhibition**

Für die jeweilige Untergruppe der TRPV sind verschiedene Inhibitoren bekannt (Tab. 1). TRPV1 wird z.B. durch Adenosin (Puntambekar, Van Buren et al. 2004) und Capsazepin, dem synthetischen Analogon des Capsaicins (Inoue, Koizumi et al. 2002), gehemmt. Für TRPV4 ist als Antagonist Gadolinium (Dhaka, Viswanath et al. 2006) bekannt und sowohl TRPV5 als auch TRPV6 werden spannungsabhängig durch Magnesium blockiert (Voets, Prenen et al. 2001, Voets, Janssens et al. 2003). Die erwähnten Rezeptorantagonisten sind spezifisch für die jeweilige Subgruppe. Allerdings gibt es auch unselektive Antagonisten, wie z.B. Rutheniumrot (Patapoutian, Peier et al. 2003, Chung, Lee et al. 2004).

Rezeptor	Temperatur-Bereich	Agonisten	Antagonisten	Expressionsort
TRPV1	> 43 °C	2-APB Capsaicin Resiniferatoxin Olvanil pH-Wert < 5,9 Anadamid HPETE 15-(S)-HPETE 5-(S)-HPETE Leukotrien B4 IGF-1 Endovanilloide Depolarisation PKC Abnahme der Phosphatidylinositol- Konzentration, ungesättigte Fettsäuren	Rutheniumrot Adenosin Capsazepin	Rückenmarksganglien Ganglion des <i>Nervus trigeminus</i> , periphere und spinale Nervenendigungen, Gehirn Harnblase Urothel Ösophagus Magen Darm Lunge Niere Milz Mastzellen Neutrophile Granulozyten Keratinocyten Pankreaszellen periphere Blutzellen
TRPV2	> 53 °C	2-APB Neuropeptide IGF-1 mechanische Dehnung, osmotische Zellschwellung	Rutheniumrot	periphere Blutzellen freie Nervenendigungen Rückenmarksganglien Gehirn, Lunge, Milz Endothelzellen nicht-neuronale Zellen des Gastrointestinaltraktes, Osteoblasten glatte Muskulatur
TRPV3	> 33 °C	2-APB Kampfer Diphenyl-haltige Wirkstoffe	Rutheniumrot	freie Nervenendigungen Rückenmarksganglien Keratinocyten, Zunge Trachea, Plazenta, Gehirn, Hoden
TRPV4	> 24 °C	Zellschwellung Scherkräfte Fettsäureamide Anadamid 4 α -PDD EET	Rutheniumrot Gadolinium	freie Nervenendigungen Rückenmarksganglien Gehirn, Keratinocyten Niere, Trachea, Herz Leber, Haarzellen der Cochlea, Merkelzellen Endothelzellen Osteoblasten glatte Muskelzellen
TRPV5		geringer intrazellulärer Kalziumspiegel, Hyperpolarisation	Rutheniumrot Magnesium	Niere Darm
TRPV6		geringer intrazellulärer Kalziumspiegel, Hyperpolarisation	Rutheniumrot Magnesium	Darm

Tabelle 1 TRPV-Charakterisierung

1.4 Rutheniumrot

Rutheniumrot ist eine chemische Verbindung, die Ruthenium enthält. In organischer Form bindet es an Ryanodin-Rezeptoren und hemmt dort die intrazelluläre Kalziumfreisetzung (Xu, Tripathy et al. 1998). Ruthenium, als chemisches Element mit dem Elementsymbol Ru und der Ordnungszahl 44, steht im Periodensystem der Elemente in der fünften Periode in der Eisengruppe (Harris 1973). Es gehört zu den Übergangsmetallen und wurde 1844 von Karl Ernst Klaus in Platinerzen entdeckt (Weeks 1932, Pitchkov 1996). Natürlich kommt es in einem Anteil von 10^{-9} in der Erdoberfläche vor. Seine Hauptanwendungsgebiete liegen in der Elektronikindustrie, wo es als Katalysator bei der Hydrierung (Sitzmann 2006), Methanisierung (Traa 1998, Traa and Weitkamp 1998) und der Ammoniaksynthese (Bielawa, Hinrichsen et al. 2001) dient. Neben elementarem Ruthenium sind auch verschiedene rutheniumhaltige Verbindungen bekannt (Sitzmann 2009). Überwiegend handelt es sich um Legierungen mit anderen Platinmetallen. Molekularwissenschaftlich sind diese im Rahmen ihrer Wirkung als Zytostatika interessant (Antonarkis & Emadi 2010, Allardyce 2001).

Der anorganische Ruthenium-Amin-Komplex Rutheniumrot ($[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_6$) wird in der Histologie als Färbemittel pektinhaltiger, anionischer, glykolisierter Substanzen und als Redoxindikator verwendet (Fassel and Edmiston 1999). Im Bereich der Elektronenmikroskopie dient er zur Darstellung von Ultrastrukturen (Dierichs 1979). Außerdem hemmt Rutheniumrot den Kalziumtransport durch Membrankanäle (Tapia and Velasco 1997). In diesem Zusammenhang fungiert Rutheniumrot als unselektiver Antagonist der TRPVs (Amann and Maggi 1991, Caterina, Rosen et al. 1999, Peier, Reeve et al. 2002, Smith, Gunthorpe et al. 2002, Xu, Ramsey et al. 2002) und blockiert Capsaicin aktivierte Kationenkanäle, sowie spannungsabhängige Kalziumkanäle. Frühere Studien zeigen, dass 100 μM des Inhibitors die Freisetzung von einem immunreaktiven Calcitonin-Gen-assoziierten-Peptid (CGRP) (Kessler, Habelt et al. 1999) in der isolierten Haut von Ratten, sowie den TRPV1-Rezeptor in *knockout* Mäusen blockieren (Petho, Izydorczyk et al. 2004). Rutheniumrot hat eine hemmende Wirkung auf Capsaicin und verhindert den Effekt schädlicher Temperaturen, der durch TRPV1 in nicht-neuronalen

Zellen und in Rückenmarksganglien induziert wird (Tominaga, Caterina et al. 1998, Kirschstein, Greffrath et al. 1999, Nagy and Rang 1999, Savidge, Ranasinghe et al. 2001, Seabrook, Sutton et al. 2002).

2 Ziel der Arbeit

In jüngeren Studien konnte erstmals gezeigt werden, dass Kaninchenspermien bei Temperaturdifferenzen von bis zu 2 °C entlang eines Temperaturgradienten in Richtung der temperaturerhöhten Bereiche schwimmen (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003, Bahat, Eisenbach et al. 2005). Diese Beobachtungen begründeten das Konzept der Spermienthermotaxis bei höheren Säugetieren. Interessanterweise ist dieses Konzept im Menschen wenig untersucht. Gleichsam sind zelluläre und molekulare Mechanismen, die der Thermotaxis zugrunde liegen, weitestgehend unbekannt. Dies führt zu folgender Fragestellung:

Hat eine Temperaturdifferenz Auswirkungen auf das Migrationsverhalten humaner Spermien und sind in diesen Prozess thermosensible Rezeptoren, wie z.B. die *Transient Receptor Potentials*, involviert?

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Phosphate buffered saline (PBS), 1x	136,89 mM NaCl	PAA, Pasching, Österreich
	2,68 mM KCl	
	5,62 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	
	1,1 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	
	1,47 mM KH ₂ PO ₄	
	ad 1000 ml ddH ₂ O	pH 7,4
Phosphate buffered saline (PBS), steril, 1x	s.o.	Serag Wiessner, Neila, Deutschland
Inhibitor	Rutheniumrot 100 µM/ 500 µM	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Isotyp	Anti-Rabbit- Immunglobulin G (IgG) Chrom Pure	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Primärantikörper	TRPV1	Polyclonal goat anti-rat TRPV1, (P-19), IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA
	TRPV3	Polyclonal goat anti-human TRPV3, (K-16), IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA
	TRPV4	Polyclonal goat anti-human TRPV4, (K-18), IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA
Sekundärantikörper	NL557 Donkey anti- rabbit-IgG	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 2 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen. Die Antikörper wurden freundlicherweise von Bernd Nilius (Department of Physiology Campus Gasthuisberg Katholieke Universiteit Leuven B-Leuven, Belgium) zur Verfügung gestellt.

3.2 Zellkultur

Humane primäre epidermale Keratinozyten, humane immortalisierte Keratinozyten der Zelllinie HaCaT, normale humane dermale Fibroblasten (NHDF), Hepatozyten (Hep G2ISO), humane embryonale Nierenepithelzellen (Hek 293), Zervixkarzinom-Epithel aus der humanen Zelllinie HeLa, humane Adenokarzinom-Enterozyten des Colons (CaCo) und humane dermale mikrovaskuläre Blutendothelzellen (BEC) wurden in ihrem jeweils spezifischem Medium kultiviert. Diese wurden zusätzlich mit einer Antibiotikallösung (1 %) aus Penicillin und Streptomycin, fötalem Kälberserum (10 %) (FCS) oder L-Glutamat (2 mM) (jeweils PAA, Pasching, Österreich) versetzt:

BEC	EGM [®] -2MV/ FCS 10 %/ Penicillin 100 U/ml/ Streptomycin 100 µg/ml
CaCo	Alpha-MEM (Modifiziertes Eagle Medium)/ FCS 10%
HaCaT	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)/ FCS 10%/ Penicillin 100 U/ml/ Streptomycin 100 µg/ml
Hek 293	DMEM/ FCS 10 %/ Penicillin 100 U/ml/ Streptomycin 100 µg/ml
HeLa	DMEM/ FCS 10 %/ Penicillin 100 U/ml/ Streptomycin 100 µg/ml
Hep G2ISO	Alpha-MEM/ FCS 10%/ Nicht-Essentielle-Aminosäuren (NEAS)/ L-Glutamat 200 µM
NHDF	Fibroblast growth medium (siehe Wachstumsmedium für Fibroblasten) (FGM) [®] -2 SingleQuots [®]
Primäre Keratinozyten	Serumfreies Keratinozyten-Medium (Kera-SFM) [®] / L-Glutamat 2 mM/ Penicillin 100 U/ml/ Streptomycin 100 µg/ml

Tabelle 3 Zelllinien und Zellkulturmedien

Alle Medien wurden von der Firma GIBCO[®] (Invitrogen, Karlsbad, CA, USA) oder Lonza (Basel, Schweiz) bezogen. Die Hoden-Ribonukleinsäure (RNS) (FirstChoice[®] Human Testes Total RNA (Ribonucleic-Acid, s. RNS) Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurde kommerziell erworben und blieb unbehandelt.

Die Zellen wurden nach Protokoll des Herstellers in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) inkubiert (INCO 2, Memmert, Schwabach, Deutschland).

3.3 Thermotaxis-Assay

3.3.1 Ejakulate

Es wurden humane Spermien von fertilen, freiwilligen, anonymen Spendern (n = 16) im Alter von 30 bis 45 Jahren nach Aufklärung und Einwilligung in der Andrologie der Hautklinik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studennummer 2265) gewonnen.

3.3.2 Spermienbehandlung

3.3.2.1 Swim-up

Die Spermienproben wurden vor dem Einsatz im Migrationsassay aufgereinigt. Dafür wurde ein *Swim-up* angefertigt, um die motilen, normalen Spermien von den veränderten, immotilen Spermien und anderen Zellbestandteilen des Ejakulats zu trennen (Oettle and Wiswedel 1989, Jameel 2008).

Hierzu wurde das jeweilige Ejakulat mit einem speziellen Spermienmedium versetzt (Sperm Preparation Medium, MediCult, Jyllinge, Dänemark), welches vor Verwendung zur Erwärmung auf Körpertemperatur in einem Brutschrank (37 °C, 6 % CO₂), (HERA Cell, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland) inkubiert wurde. Es folgte eine 1:2 Verdünnung und eine anschließende Zentrifugation [10 min, 1500 U/min, RT (Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, Bäch, Schweiz)]. Der Überstand wurde bis zum Pellet abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Medium resuspendiert und 1 h in einem Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand mit den motilen Zellen abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Der Rest wurde verworfen.

3.3.2.2 Auszählung und Verdünnung der Spermienzellzahl

Die Spermien wurden in einer Neubauer-Zählkammer (Superior Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland) ausgezählt

(Sukcharoen, Ngeamjirawat et al. 1994). Dazu wurden die Spermien in einer Konzentration von 1:10 mit einer Trypanblau (Trypan blue stain 0,4 %, GIBCO®, Schottland, U.K.) -Paraformaldehyd-Lösung (PFA, 0,25%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) verdünnt. Die Spermienkonzentration (Anzahl pro ml) wurde durch die Multiplikation der Zellzahl mit 10×10^4 errechnet. Zellen wurden mit Medium (Sperm Preparation Medium, MediCult, Jyllinge, Dänemark) entsprechend einer Endkonzentration von 2 Millionen Spermien pro 1 ml verdünnt.

3.3.3 Migrationsassay

3.3.3.1 Aufbau

Für den Migrationsassay wurde in Kooperation mit Prof. Dr. med. Stefan Werner Schneider (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsmedizin Mannheim und Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg) eine modifizierte Zigmond-Kammer mit zwei voneinander getrennt beheizbaren Kammern konstruiert (Abb. 3).

Die Zigmond-Kammer wurde erstmalig 1977 von Sally H. Zigmond zur Beobachtung von Chemotaxis neutrophiler Granulozyten beschrieben (Zigmond 1977). Das Zwei-Kammer-System aus Plexiglas, verbunden über eine „Brücke“, wurde auf einer Seite mit entsprechenden Substraten gefüllt, die andere beinhaltete die neutrophilen Granulozyten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zigmond-Kammer für die Analyse von Spermien entlang eines Thermogradienten durch die Integration von zwei beheizbaren Thermoplatten modifiziert. Zur Beobachtung der Migration wurde ein inverses Mikroskop mit angeschlossener Kamera (*Time-lapse*-Video-Mikroskopie-System, Zeiss AxioCam HRc mit AxioVision 4.1 Software, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet (Abb. 3).

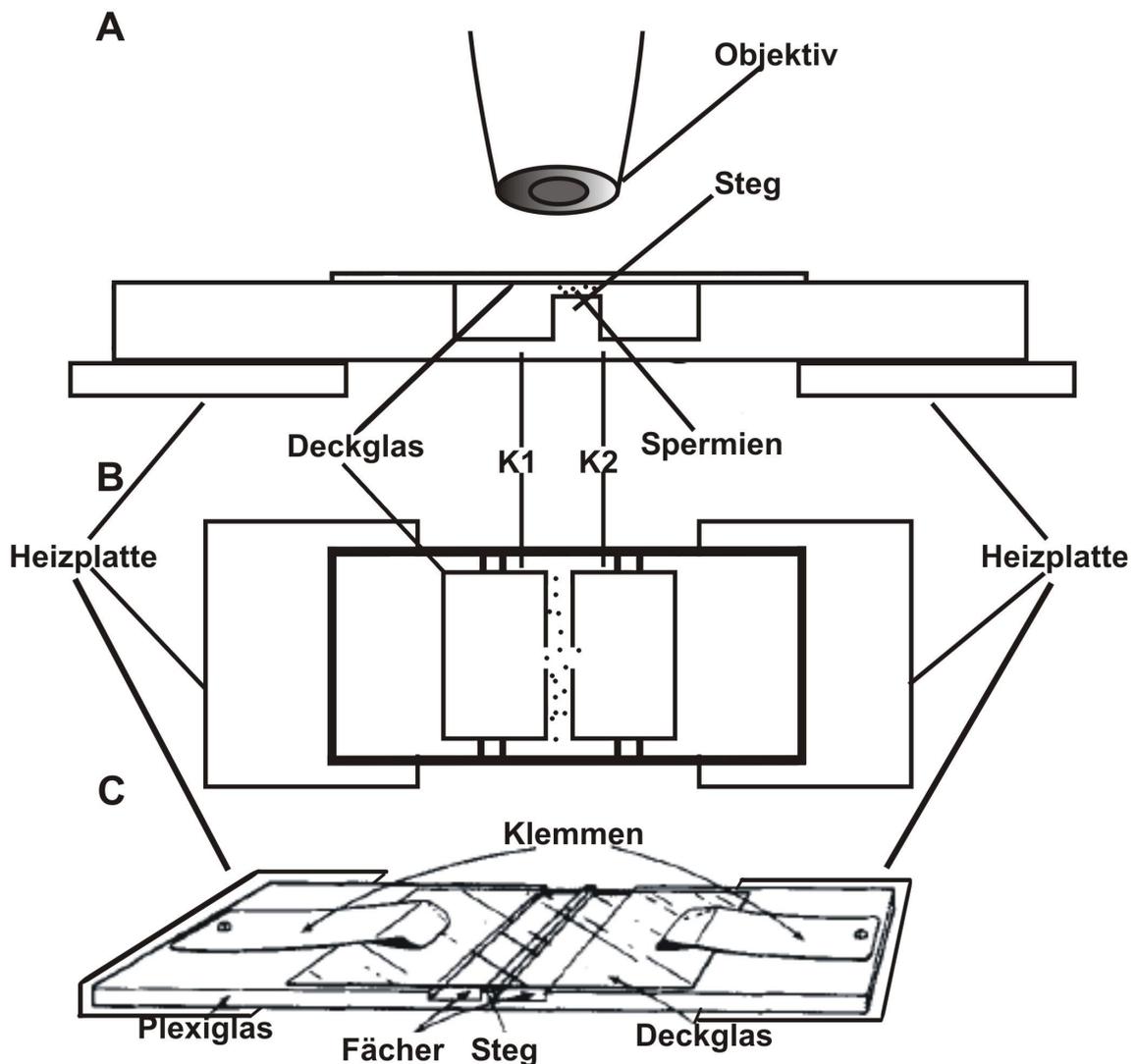


Abbildung 3 Thermotaxis-Assay. Darstellung der Spermienmigration in einer modifizierten Zigmond-Kammer mit einem *Time lapse*-Video-Mikroskopie-System in transversaler Ausrichtung (A), in Aufsicht (B) und perspektivisch (C). Der Temperaturgradient von 34 °C – 37 °C wird zwischen den zwei voneinander getrennt beheizbaren Thermokammern (K1, K2) generiert. Die Spermienmigration erfolgt entlang des Temperaturgradienten über den Steg zwischen den zwei Kammern (*modifiziert nach Zigmond 1977 und Fabro et al. 2002*).

Es erfolgte der Aufbau folgender Modalitäten für jeweils denselben Probanden:

1. ohne Gradient bei 37 °C
2. mit Temperaturgradient (34 °C – 37 °C)
3. mit Gradient (34 °C – 37 °C) und TRPV-Inhibitor (Rutheniumrot)

Beide Kammern der modifizierten Zigmond-Kammer wurden mit je 100 µl der verdünnten Spermienlösung befüllt. Sobald die ersten Zellen über dem Steg sichtbar wurden, erfolgte die Aufnahme der Migration für sechs Minuten.

3.3.3.2 Erstellung eines Temperaturgradienten

Die Einstellung des Temperaturgradienten von 34 °C bis 37 °C erfolgte manuell über das Bedienungsinterface der Kammer. Der Temperaturgradient wurde manuell mit einem digitalen Thermometer entlang der Stegseiten kontrolliert. Die Messgenauigkeit des Thermometers lag bei 0,01 °C.

3.3.3.3 Migrationsversuch ohne Temperaturgradient

Für die Beobachtung des Migrationsverhaltens humaner Spermien wurde die Temperatur der auf einem Heiztisch platzierten, modifizierten Zigmund-Kammer kontinuierlich bei 37 °C gehalten.

3.3.3.4 Zusatz eines Inhibitors

Die verschiedenen Modalitäten wurden pro Proband in zwei Versuchsreihen durchgeführt. Zur unselektiven Blockade von Kationenkanälen wurde der Inhibitor Rutheniumrot (Molekulargewicht 768,35 g/mol; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 100 µM bzw. 500 µM eingesetzt. Der Inhibitor wurde vor Befüllung der Kammer der verdünnten Spermienlösung zugesetzt und für 1 h im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Spermien/Rutheniumrot-Lösung wie beschrieben (siehe 4.3.3.1) im Migrationsassay unter Verwendung eines Temperaturgradienten eingesetzt.

3.3.4 Bearbeitung des Filmmaterials

3.3.4.1 Verschlüsselung

Nach Aufzeichnung der Filme wurden diese so verblindet, dass eine Zuordnung zur jeweiligen Untersuchungskondition bei der Auswertung nicht möglich war. Erst nach erfolgter Migrationsanalyse wurde die Verblindung der Filme aufgehoben.

3.3.4.2 Schneiden der Filmsequenzen

Die Filmsequenzen wurden mit Hilfe der Virtual Dub.1.7.8 Software (Avery Lee) geschnitten, sodass aus einer 6 min-Filmsequenz jeweils drei Filme von je einer Minute Dauer zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten erstellt wurden. Als Zeitpunkte wurden folgende Migrationszeitpunkte gewählt:

1. nach 2 Minuten
2. nach 4 Minuten
3. nach 6 Minuten

3.3.4.3 Migrationsanalyse

Die einzelnen Filmsequenzen mit den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden computerassistent ausgewertet. Zur Analyse der Spermienmigration wurde die Bewegung aller Spermien in einem Beobachtungszeitfenster unter Verwendung der Image J 1.37c Software (Wayne Rasband, National Institute of Health) verfolgt. Die Startpunkte der Zellmigrationstrajektoren wurden an den Nullpunkt eines Koordinatensystems gelegt. Die X- und Y-Werte der jeweiligen Endpunkte dienten der weiteren Analyse des Migrationsverhaltens. Die Auswertung erfolgte entsprechend verschiedener von Fabro und Mitarbeitern publizierten Formeln zur Bestimmung der gerichteten Zellmigration (Fabro et al., 2002) auf folgende Parameter: zum einen wurde Δx , die Summe der Migrationsstrecken, die die Spermien entlang des Temperaturgradienten (x-Achse) zurücklegten, berechnet. Zum anderen wurde der prozentuelle Anteil der Spermien, die in Richtung des Gradienten ($\Delta x > 0$) migrierten, kalkuliert. Werte $> 50\%$ zeigen hierbei eine Migration in Richtung des Temperaturgradienten, d.h. zur wärmeren Kammerseite hin, an. Schließlich wurde der prozentuale Anteil der Spermien bestimmt, die eine weitere Strecke in Richtung des Temperaturgradienten (x-Achse) zurücklegten, als in der Richtung orthogonal zum Gradienten (y-Achse) $\Delta x > 0 / |(\Delta y)| > 1$. Werte $> 25\%$ zeigen hierbei eine gerichtete Migration in Richtung des Temperaturgradienten an (Fabro et al., 2002).

3.4 Spermien-Zytospin

Zytospins wurden nach einem Standardprotokoll angefertigt. Dazu wurden 200.000 aufgereinigte Spermien mit Hilfe eines speziellen Zytospin-Sets (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) sowie einer anschließenden Zentrifugation [3 min, 1180 U/min, 4 °C (Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, Bäch, Schweiz)] auf einen beschichteten Objektträger (HistoBond® Objektträger, P. Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshofen) aufgetragen. Die Zentrierhilfe wurde verworfen und nach weiterer Zentrifugation (1 min, 1180 U/min, 4 °C) wurden die Präparate luftgetrocknet. Nach Lagerung bei -80 °C konnten die Zytospins zur Immunfluoreszenz-Färbung verwendet werden.

3.5 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung ist eine Technik, mit der spezifische Strukturen von Zellen auf Proteinebene dargestellt werden können (Lottspeich 2012). Das Prinzip besteht darin, dass bestimmte Antikörper gegen spezifische Oberflächenstrukturen von Zellen gerichtet sind und daran binden. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, werden die Zellen im Voraus mit Pferdeserum behandelt. An einen Primärantikörper binden gegen ihn gerichtete Sekundärantikörper, welche mit einem Fluorochrom konjugiert sind. Die Immunfluoreszenzen wurden mit dem Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung der Software Axiovision 4.7 (Zeiss, Jena, Deutschland) detektiert.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde, ausgenommen der Antikörper-abhängigen Veränderungen, nach Standardprotokoll vorgenommen. Die spezifischen Antikörper wurden in PBS (PAA, Pasching, Österreich) mit Pferdeserum (2 %) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) in einer Konzentration von 7 µg/ml (TRPV1), 5 µg/ml (TRPV3) und 5 µg/ml (TRPV4) eingesetzt. Der Isotyp Anti-Rabbit-IgG (Chrom Pure, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) wurde in einer Konzentration entsprechend zum Primärantikörper verwendet. Nach einstündiger Inkubation wurden die Objektträger gewaschen (2 x 5 min in PBS). Danach erfolgte die Zugabe des rot-fluoreszierenden Sekundärantikörpers (NL557 Donkey anti-rabbit-IgG, R&D Systems,

Minneapolis, USA) mit einer Endkonzentration von 4 µg/ml. Nach einer 45-minütigen Inkubation des Sekundärantikörpers wurden die Spermien mit einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Kernfärbung (DAPI, dilactate, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA; Endkonzentration von 3 µg/ml) sowie Phalloidin (Phalloidin Conjugate, Promo-Fluor-488 Premium, Promo Kine, Heidelberg, Deutschland; Endkonzentration von 4,1 µg/ml) zur Darstellung des Zytoskeletts gefärbt. Nach abschließender Inkubation (20 min) wurden die Objektträger mittels Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) eingedeckt und über Nacht in einer Dunkelkammer bei Raumtemperatur getrocknet. Die Fluoreszenzbilder wurden am nächsten Tag mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Jena, Deutschland) und der Axiovision 4.7 Software (Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt.

3.6 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das der Differenzierung von Zellen dient. Zellen, die einen Laserstrahl passieren, senden optische Signale aus und streuen einen Teil des Lichts, das mit spezifischen Detektoren (sog. Photomultipliern) erfasst wird (Lottspeich 2012). Die Menge des gestreuten Lichts korreliert dabei mit der Größe und Komplexität der jeweiligen Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel zur Zelle und ist abhängig vom Zellvolumen. Das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) beschreibt die Lichtbrechung im rechten Winkel zur Zelle. Sowohl Granularität als auch Größe und Struktur des Zellkerns nehmen darauf Einfluss. Mittels des Durchflusszytometers (FACS, *fluorescence activated cell sorter*, s. fluoreszenzaktivierter Zellsortierer) können auch Fluoreszenzfarben detektiert werden. Zur Analyse der Zellen werden Desoxyribonukleinsäure-interkalierende Farbstoffe, wie zum Beispiel DAPI, sowie fluoreszenzmarkierte Antikörper genutzt. Der Einsatz verschiedenfarbiger Laser und Filter, die die Fluoreszenzsignale verstärken bzw. auftrennen, erhöht dabei die Anzahl einsetzbarer Farbstoffe.

Um das Expressionsmuster der TRPV auf Spermien zu untersuchen, wurden die Zellen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Zu jeder Färbung wurde eine geeignete Isotypkontrolle unter gleichen

Färbebedingungen erstellt. Die Analyse der Spermien wurde mit dem FACScalibur Flowcytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) und der CellQuest Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) durchgeführt. Es wurden 50.000 Ereignisse erfasst und graphisch dargestellt. Für die Erstellung eines Expressionsprofils wurden 5 Millionen aufgereinigte Spermien verwendet. Die Zellen wurden mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen und humanem Serum (AB-Humanserum, steril, Dynal Biotech, WI, USA) geblockt. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (1500 U/min, 10 min, RT; Hettich 1302 mit Rotor #1323, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) und anschließend in einer geeigneten Menge PBS aufgenommen. Zur Durchflusszytometrie-Analyse wurden die Primärantikörper TRPV1, TRPV3 und TRPV4 nach Angaben des Kooperationspartners (s.o.) eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Chrom Pure, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), der in einer Konzentration entsprechend zum Primärantikörper verwendet wurde. Nach einer 45-minütigen Inkubation im Dunkeln bei 4 °C wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und in geeigneter Menge PBS resuspendiert. Als Sekundärantikörper wurde NL557 (Donkey anti-rabbit-IgG, R&D Systems, Minneapolis, USA) in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt und 15 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Abschließend wurden die Proben nochmals mit PBS gewaschen, zentrifugiert und mit 250 µl Paraformaldehyd (1 %) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) fixiert. Die Proben wurden durchflusszytometrisch analysiert.

3.7 RNA-Isolierung und Reverse-Transkriptions-

Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

RNA wurde aus Zellen und Geweben mittels TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), einem Ein-Phasen-Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert, extrahiert und in komplementäre Desoxy-Ribonucleinsäure (engl. *complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA) umgeschrieben. Die Synthese der cDNA erfolgte nach Standardprotokoll durch die RT-PCR.

3.7.1 RNA-Extraktion

Zur Lyse wurden die Zellen in einer 6-Well-Platte (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) in 1 ml TRIzol[®] (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Anschließend erfolgte unter Zugabe von 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) pro Well die Phasentrennung. Nach Vortexen der Probe (Bio Vortex V1, Fischer & Rintelen GmbH, Essen, Deutschland) und anschließender Zentrifugation (12.000 U/min, 15 min, 4°C) (Biofuge 13R, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland) wurde die obere wässrige, RNA-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt; die Interphase und die rötliche Phenolphase wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde nun mit 500 µl Isopropanol (Merk, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Nach Inkubation über Nacht (-20°C) wurde das Gemisch zentrifugiert (12.000 U/min, 30 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die gefällte RNA wurde im Anschluss mit 80%-igem Ethanol (Merk, Darmstadt, Deutschland) gewaschen, zentrifugiert (12.000 U/min, 30 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurde das Pellet luftgetrocknet (10 min, RT) und in einer geeigneten Menge Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H₂O) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Die Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.7.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Absorption mit einem Spektralphotometer (NanoDrop[™] 2000, Thermo Scientific, Wilmington, Deutschland) im Bereich der Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Dabei dient die Absorption (A) bei 260 nm als Referenzwert. Die Absorption bei 280 nm zeigt den Proteingehalt der Lösung an, bei einer Wellenlänge von 320 nm wird dagegen die Streuung angezeigt. Der Messwert der Absorption bei 320 nm wird von den Messwerten bei 260 nm und 280 nm abgezogen. Der Quotient A_{260} / A_{280} stellt die Reinheit der Proben dar, die Nukleinsäuren enthalten und liegt bei unkontaminierten Proben zwischen 1,8 und 2,1. Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook et al. (Sambrook 1989) berechnet.

3.8 Quantitative PCR (qPCR)-Analyse

Die qPCR-Analyse wurde zur quantitativen Darstellung verschiedener Transkriptionslevel der TRPV-Genexpression durchgeführt.

3.8.1 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte mittels RT-PCR. Dabei wird die Boten-RNA (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) enzymatisch mittels reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in cDNA umgeschrieben (Lottspeich 2012).

Zu 4 µg RNA in 10 µl DEPC-Wasser wurden folgende Reagenzien hinzugegeben:

- 1 µl rekombinante Desoxyribonuclease (10 U/µl, Roche, Mannheim, Dtl.)
- 1,5 µl 5x RT-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 1 µl RNasin[®]Plus (40 U/µl, Promega, Madison, WI, USA)
- 2,5 µl DEPC-H₂O

Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei 37 °C und 10 min bei 70 °C im Thermocycler (Biometra TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Die Initiierung der RNA erfolgte unter Zugabe von 3,6 µl Oligodeoxythymidinsäure (Oligo-dt) (0,5 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 0,4 µl Random Primer (500 µg/ml, Promega, Madison, WI, USA) mit anschließender Inkubation im Thermocycler für 10 min bei 70 °C. Für die Einzelstrangsynthese der cDNA wurden weitere Substanzen zugefügt und im Thermocycler ein weiteres Mal für 2 min bei 42°C inkubiert:

- 4,5 µl 5x RT-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 1,5 µl Desoxyribonukleotid-Triphosphat(dNTP)-Mix (2,5 mM, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 1 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 1 µl RNasin[®]Plus (40 U/µl, Promega, Madison, WI, USA)

Die Transkription der cDNA erfolgte durch anschließende Zugabe der Transkriptase (Superscript II, 200 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und der Inkubation bei 42 °C für 50 min. Danach erfolgte die Enzyminaktivierung für 10 min bei 70°C. Abschließend wurde die cDNA auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt und die Proben bei -80 °C gelagert.

3.8.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die PCR ist eine Amplifikationssmethode für Nukleinsäuren, bei der in mehreren Zyklen Komplementärstränge einer DNA-Matrize enzymatisch amplifiziert werden (Lottspeich 2012).

Dabei besteht die PCR aus drei verschiedenen Phasen, die sich ständig wiederholen. Bei der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt, eventuelle Sekundärstrukturen werden aufgelöst. In der Anlagerungsphase (*Annealing*) lagern sich die eingesetzten Primer an die komplementäre Sequenz der Ziel-DNA an. Am freien 3' OH-Ende der Primer wird dann während der Elongation ein komplementärer Strang in 5'→3' Richtung synthetisiert. Für diese Reaktion wird die hitzestabile Polymerase des *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) genutzt. Da die Primer gegenläufig sind, kann so ein bestimmtes DNA-Produkt definierter Größe amplifiziert werden. Die Amplifikation verläuft exponentiell.

Zur Quantifizierung der Gen-Expression wurde eine qPCR durchgeführt. Sie basiert darauf, dass ein spezifisches Produkt nach Amplifikation während eines PCR-Zyklus über Fluoreszenzmessung quantitativ dargestellt wird. Das Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur Menge der Zielsequenz. Zur Messung der Amplifikation stehen zwei Messsysteme zur Verfügung. Die erste Möglichkeit zur Quantifizierung bietet die Anwendung von SYBR[®]Green. SYBR[®]Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz. Nach der PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die PCR-Produkte unterschieden werden können. Dabei wird die DNA unter kontinuierlicher Temperaturerhöhung aufgeschmolzen. Jedes amplifizierte Fragment hat eine spezifische Schmelztemperatur, bei welcher der Doppelstrang denaturiert und der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]Green freigesetzt wird. Die zweite Möglichkeit ist die Anwendung einer TaqMan-Sonde (Hydrolyse-Sonde), die an einem Ende mit einem Quencher, an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein) gekoppelt ist. Der Reporter, ein Donor-Fluorochrom, wird durch eine Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil seiner Energie an ein Akzeptor-Fluorochrom, den Quencher, ab. Die Fluoreszenz des Reportes wird vom Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer,

FRET) unterdrückt. Die Hydrolyse-Sonde hybridisiert mit dem cDNA-Strang und wird während der Synthese des Gegenstranges von der *Taq*-Polymerase, dem amplifizierenden Enzym, aufgrund ihrer Exonukleaseaktivität abgebaut. Die Fluoreszenz des Reporters wird danach nicht mehr durch den Quencher gelöscht und ist somit messbar. Wird der Abstand zwischen Akzeptor und Donor größer, so steigt also das Fluoreszenzsignal auf der Seite des Donors (Reporters). Die Fluoreszenz steht dabei in einem proportionalen Verhältnis zur Menge des PCR-Produktes und wird am Ende der Elongationsphase in jedem Zyklus gemessen. Das Fluoreszenzsignal wird dabei logarithmisch gegen die Zyklusanzahl aufgetragen. Man erhält eine Amplifikationskurve der cDNA, die in drei Phasen eingeteilt werden kann. Initial wird nur wenig cDNA amplifiziert, daher ist das Fluoreszenzsignal nur schwach und die Kurve verläuft flach. Es folgt eine Phase, in der die cDNA-Amplifikation exponentiell ansteigt und zu einem Peak der Kurve führt, um abschließend nach Verbrauch der Reagenzien auf ein Endplateau abzuflachen. Von Bedeutung für diese Messmethode ist der sogenannte Schwellenwert-Zyklus (engl. *Cycle Threshold* (Ct)-Wert). Er stellt den Zyklus dar, bei dem die Intensität der Fluoreszenz signifikant die Intensität der Hintergrund-Fluoreszenz übertrifft. Ct-Wert und amplifizierte Menge sind umgekehrt proportional zueinander. Das hat zur Folge, dass die Gene, die höhere Expressionsraten haben und somit initial eine höhere Kopienzahl, eher während der Amplifikation erscheinen und niedrigere Ct-Werte aufweisen. Zum Vergleich der einzelnen Proben wurde die Expression des Zielgens gegen die Expression der ribosomalen 18S RNA (rRNA) normalisiert. Das 18S rRNA-Gen ist ein Standardgen, das in verschiedenen Zellen in konstanten Mengen exprimiert wird.

Die beschriebene qPCR wurde mittels des ABIPrism7000 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) und unter Verwendung des TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) oder TaqMan[®] SYBR[®]Green Master Mix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die spezifischen Primer für TRPV wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Folgende genspezifische Reaktionsansätze wurden mit einem Zielvolumen von 25 µl pro *Well* angesetzt:

	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Mastermix	Ziel-Sonde	cDNA [25ng/μl]	DEPC
18S rRNA (TaqMan®)	0,15 μl [10 μM]	0,15 μl [10 μM]	12,5 μl	0,15 μl [10 μM]	10 μl	2,05 μl
SYBR® Green	2,5 μl [2 μM]				10 μl	

Tabelle 4 Genspezifische Reaktionsansätze

Es wurde eine TaqMan® 18S RNA-spezifische Sonde (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) mit entsprechenden 18S-Vorwärts- und Rückwärts-Primern eingesetzt. Die cDNA wurde mit genspezifischen Primerpaaren für die Expression von TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4 (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) und SYBR® Green Master Mix amplifiziert:

	Vorwärtsprimer [45 μM]	Rückwärtsprimer [45 μM]
TRPV1	GGCTGTCTTCATCATCCTGCTGCT	GTTCTTGCTCTCCTGTGCGATCT TGT
TRPV2	CTTCCTTTTCGGCTTCGCTGTAG	GCACTGACTCTGTGGCATTGG
TRPV3	TCCTCACCTTTGTTCTCCTCCT	CGCAAACACAGTCGGAAATCAT
TRPV4	CTACGCTTCAGCCCTGGTCTC	GCAGTTGGTCTGGTCCTCATTG

Tabelle 5 Primersequenzen (Spinsanti, Zannolli et al. 2008)

Die qPCR wurde bei folgenden Reaktionstemperaturen durchgeführt:

Temperatur	Zeit	
95 °C	10 min	
50 °C	2 min	
60 °C	1 min	} 40 Zyklen
95 °C	15 s	

Die Zyklenzahl wurde auf 40 begrenzt. Im Rahmen der absoluten Quantifizierung wurden wie beschrieben die ΔC_t -Werte der spezifischen Gene und des Kontrollgens bestimmt und die Amplifikationskurven mit der Standardkurve verglichen:

$$\Delta C_t = 10^5 \cdot 2^{C_{t,Kontrolle} - C_{t,spezifische\ Probe}}$$

Die Genexpression wurde graphisch in Form eines Balkendiagrammes mit Standardabweichung dargestellt.

3.9 Computer-basierte quantitative Auswertungen

Die Spermienmigration wurde mit der Image J Software (Bethesda, MD, USA) ausgewertet. Dabei wurde die jeweilige Migration der einzelnen Spermien verfolgt und in ein Koordinatensystem mit x-Achse und y-Achse übertragen. Die Startpunkte der Zellmigrationstrajektoren wurden an den Nullpunkt des Koordinatensystems gelegt. Die Endpunkte der zurückgelegten Strecke des jeweiligen Spermiums wurden auf beide Achsen und ihren Startpunkt bezogen (Abb. 4).

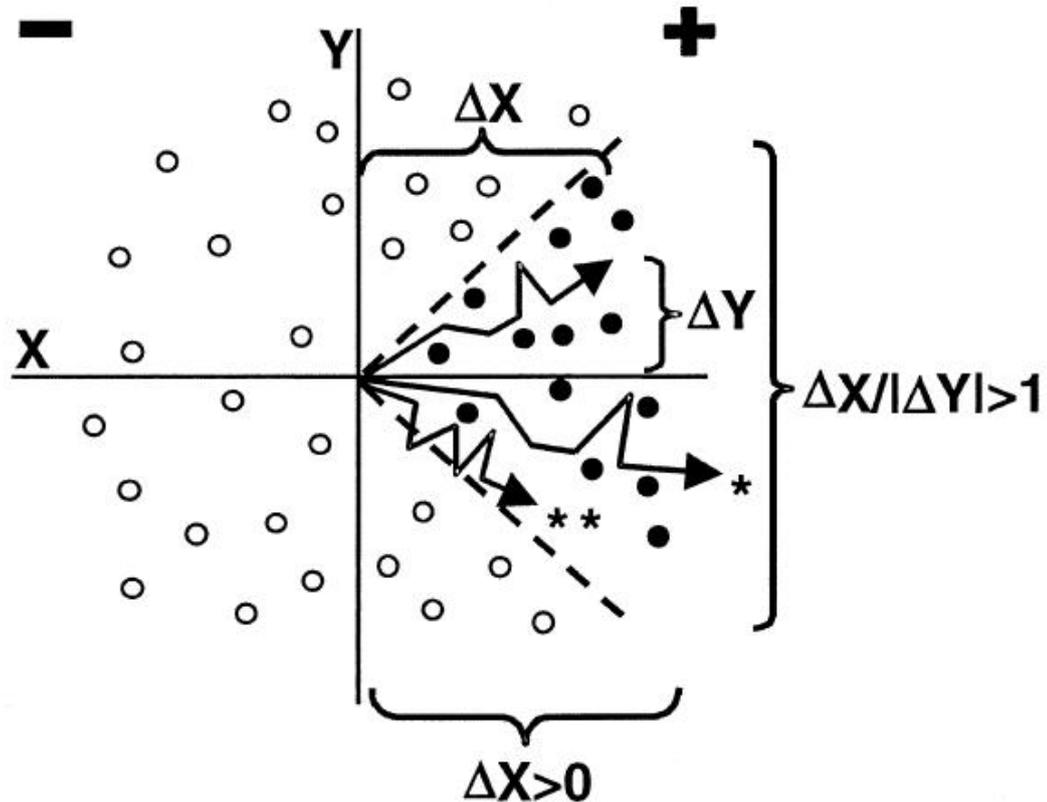


Abbildung 4 Analyse der Migration humaner Spermien in einem Koordinatensystem. Die Migration jedes Spermiums (•) wird ausgehend vom Nullpunkt innerhalb eines 90°-Winkels, der den Bereich für die wahrscheinliche Lokalisation thermosensibler Zellen umfasst, bis zum jeweiligen Endpunkt der Migrationsstrecke abgebildet. Folgende Bedingungen werden analysiert: Δx stellt die Migrationsstrecke parallel zum Temperaturgradienten dar, Δy bezeichnet die Spermienmigration im 90°-Winkel zur x-Achse. $\Delta x > 0$ betrifft den prozentualen Anteil der Spermien, die eine weitere Migrationsstrecke als Null in Richtung des Temperaturgradienten zurücklegen. $\Delta x > 0/|\Delta y| > 1$ veranschaulicht den prozentualen Anteil der gerichteten Spermienmigration, d.h. es werden nur die Zellen berücksichtigt, die eine weitere Migrationsstrecke entlang des Temperaturgradienten zurücklegen als die Spermien, die im 90°-Winkel zur x-Achse migrieren. Die Berechnung des prozentualen Anteils der Spermien, die eine weitere Strecke als Null in Richtung des Temperaturgradienten zurücklegen, beinhaltet die Punkte auf der rechten Seite des Koordinatensystems (+). Zur Berechnung der Werte für die gerichtete Spermienmigration ($\Delta x > 0/|\Delta y| > 1$) wird die Migration jedes Spermiums innerhalb des Bereiches für die wahrscheinliche Lokalisation thermosensibler Spermien (90°-Winkel ausgehend vom Nullpunkt) erfasst (•). Spermien, die im 45°-Winkel nach oben bzw. unten in der Kammer abweichen oder sich entgegen des Temperaturgradienten (○) bewegen, werden von der Berechnung ausgeschlossen (Fabro, Rovasio et al. 2002).

3.9.1 Migrationsstrecke der Spermien

Zur Darstellung der zurückgelegten Strecke der Spermien parallel zur x-Achse wurden die Mittelwerte der Endpunkte von Δx zu den jeweiligen Zeitpunkten nach 2 min, 4 min und 6 min in allen drei Versuchsvarianten (mit Gradient, ohne Gradient und mit Inhibitor) berechnet. Die x-Achse definiert die Richtung des

Gradienten. Δx stellt die Summe der Migrationsstrecke aller Zellen entlang des Wärmegradienten dar. Die Berechnung der Migrationsstrecke erfolgte unter Einbeziehung der Beobachtung, dass die durchschnittliche Migrationsstrecke von Spermien, die sich ungerichtet bewegen, bei Null liegt (Fabro, Rovasio et al. 2002). Eine Migrationsbewegung in Richtung des Wärmegradienten wird durch eine positive Bewegung auf der x-Achse angezeigt.

Es wurden sowohl die Einzelzeitpunkte zusammengefasst von allen Probanden abgebildet, als auch die Zusammenfassung aller drei Zeitpunkte (Abb. 6). Unter Berücksichtigung der Standardabweichung wurden die Werte visualisiert.

3.9.2 Migration in Richtung des Gradienten

Um die Spermien zu betrachten, die in Richtung des Gradienten geschwommen sind, wurden die x-Werte unter der Bedingung $\Delta x > 0$ für die einzelnen Zeitpunkte zusammengestellt. Nur die Spermien, die sich entlang der positiven x-Achse in Richtung des Gradienten bewegten, wurden dabei berücksichtigt. Dieser zweite Parameter schließt demnach alle Spermien aus, die sich zur negativen Seite der x-Achse in die oppositionelle Richtung des Gradienten bewegen. Hierbei liegt der entsprechende Anteil von Zellen bei ungerichteter Migration bei 50 %. Der Wert für die gerichtete Spermienmigration liegt entsprechend über 50 % (Fabro, Rovasio et al. 2002). Die Berechnungen erfolgten für alle drei Versuchsoptionen, wobei jeweils die Einzelzeitpunkte oder deren graphische Zusammenfassung dargestellt sind (Abb. 7). Für die Darstellung der Einzelzeitpunkte wurden für jeden Minuten-Ausschnitt die Werte aller drei Probanden für diesen Zeitpunkt zusammengefasst.

3.9.3 Gerichtete Migration in Richtung des Gradienten

Die gerichtete Migration unterscheidet sich von der einfachen Migration in Richtung des Gradienten darin, dass nur die Zellen betrachtet werden, die auf der x-Achse im Verhältnis zur y-Achse eine längere Strecke in Richtung der höher temperierten Kammerseite zurücklegen, als auf der y-Achse. Demzufolge wurden die Spermien, die in einem 45°-Winkel nach oben oder unten in der Kammer abweichen, von der Berechnung ausgeschlossen. Die Berechnung zur gerichteten Migration wurde mit der Formel $\Delta x > 0 / |\Delta y| > 1$ durchgeführt. Hierbei

liegt der Anteil der entsprechenden Spermien bei ungerichteter Migration bei 25%. Der Anteil der Spermien, die gerichtet unter Einfluss des Wärmegradienten aufgrund ihrer Thermosensibilität entlang des Gradienten schwimmen, liegt folglich bei >25 % (Fabro, Rovasio et al. 2002).

Für die Visualisierung der Migration wurden die Einzelwerte (2 min, 4 min, 6 min) sowie deren Zusammenfassung für alle drei Versuchsoptionen (Abb. 8) berechnet.

3.9.4 Signifikanz

Zur Berechnung der Signifikanz wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Verglichen wurden folgende Versuchsbedingungen:

1. fehlender Temperaturgradient zu Temperaturgradient (34 °C – 37 °C)
2. Temperaturgradient mit und ohne Inhibitor (100 µM / 500 µM)

Die Signifikanz wurde sowohl für die Darstellung der zurückgelegten Migrationsstrecke und der Migration in Richtung des Gradienten, als auch für die gerichtete Migration in Richtung des Gradienten berechnet. Die Wahrscheinlichkeiten (P-Werte) geben dabei an, ob ein Unterschied signifikant ist. Liegt der P-Wert unter 0,05, wird von signifikanten Abweichungen gesprochen (*), P-Werte <0,01 stellen höher signifikante Werte dar (**) und Wahrscheinlichkeiten, die <0,001 sind, werden als hoch signifikant angesehen (***).

4 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Thermotaxis humaner Spermien, einer gerichteten Migration von Spermien entlang eines Temperaturgradienten, wurde ein videomikroskopischer Thermotaxis-Assay etabliert. In diesem Kontext wurde auch der Effekt des unspezifischen TRPV-Inhibitors Rutheniumrot auf das Migrationsverhalten humaner Spermien untersucht. Weiterhin wurden Spermien in umfassenden Analysen sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene auf die Expression von TRPVs untersucht.

4.1 Migrationsverhalten von Spermien unter Einfluss eines Temperaturgradienten

Zur Untersuchung des Einflusses eines Temperaturgradienten auf das Migrationsverhalten von Spermien wurde in einer modifizierten Zigmond-Kammer ein Temperaturunterschied von 34 °C - 37 °C generiert. Die Spermienmigration wurde zu definierten Zeitpunkten (2 min, 4 min, 6 min) dokumentiert. Das Migrationsverhalten unter Einfluss eines Gradienten wurde der Migration bei gleichbleibender Temperatur (37 °C) gegenübergestellt. Zusätzlich wurde verglichen, wie sich das Migrationsverhalten von Spermien unter Zugabe des unselektiven TRPV-Rezeptorinhibitors Rutheniumrot bei bestehendem Gradienten verändert. Der Inhibitor wurde in verschiedenen Konzentrationen von 100 µM und 500 µM getestet. Die Spermienbewegung wurde in Form von Migrationstrajektoren dargestellt. Dazu wurde die Migration jedes Spermiums in einem Koordinatensystem ausgehend vom Nullpunkt bis zum jeweiligen Endpunkt der Migrationsstrecke abgebildet (Abb. 5A, 5B). Zudem ist die Migrationsrichtung mit Migrationsvektor (Abb. 5C, 5D) und Hauptmigrationsvektor (Abb. 5E, 5F) dargestellt. Migrationstrajektoren auf der höher temperierten Kammerseite sind rot (r), die auf der niedriger temperierten Seite schwarz (s) kodiert (Abb. 5A, 5B).

Ohne Gradienten zeigt sich ein Verhältnis von 47,6 % (s) zu 52,4 % (r) (Abb. 5A) bzw. 51,8 % (s) zu 48,2 % (r) (Abb. 5B). Unter Einfluss des Temperaturgradienten steigt der Anteil der Spermienmigrationstrajektoren auf der höher temperierten Kammerseite um 23,6 % auf 61,8 % (r) (Abb. 5A), bzw.

um 16,6 % auf 58,3 % (r) (Abb. 5B). Der Hauptmigrationsvektor zeigt in Richtung der höher temperierten Kammerseite (Abb. 5E, 5F). Nach Applikation von 100 μ M bzw. 500 μ M des Inhibitors Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine tendenzielle Abnahme der Migrationstrajektoren um 15,8 % auf 57,9 % (r) (Abb. 5A) bzw. um 18,1 % auf 59 % (r) nachweisbar (Abb. 5B). Dementsprechend verändert sich die Richtung des Hauptmigrationsvektors (Abb. 5E, 5F).

Es wurden Spermien verschiedener Donoren (n = 16) untersucht. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Signifikante Ergebnisse zeigten sich in einer Aufnahmezeit von maximal 6 Minuten bei folgenden Versuchsbedingungen: 1. Fehlender Temperaturgradient zu Temperaturgradient (34 °C – 37 °C); 2. Temperaturgradient mit und ohne Inhibitor. Analysiert wurden die Migrationsstrecke und die ungerichtetet sowie gerichtete Spermienmigration entlang des Temperaturgradienten. Der Vergleich der Bedingungen „ohne Gradient“ und „mit Temperaturgradient“ zeigte eine signifikante Distanzänderung der Migrationsstrecke der Spermien (P = 0,0014, Abb. 6A). Nach Applikation von Rutheniumrot in Konzentrationen von 100 μ M bzw. 500 μ M bei bestehendem Temperaturgradienten war eine tendenzielle Abnahme der Migrationsstrecke (Abb. 6A, B) nachweisbar. Zudem war in dem Thermotaxis-Assay dieser Arbeit eine signifikante Zunahme der gerichteten Spermienmigration in Richtung des Temperatur-Gradienten (P = 0,0020, Abb. 8A; P = 0,0094, Abb. 8B) nachweisbar. Dementsprechend wurde eine Zunahme des prozentualen Anteils der Spermien beobachtet, die gerichtet unter Einfluss des Temperaturgradienten migrieren, und zwar um 9,17 % von 19,67 % auf 28,84 % (Abb. 8A) bzw. um 12,44 % von 26,34 % auf 38,78 % (Abb. 8B). Nach Applikation von Rutheniumrot (500 μ M) wurde eine signifikante Abnahme der Spermienmigration um 17,57 % von 38,78 % auf 21,21 % in Richtung des Temperaturgradienten nachgewiesen (P = 0,0006, Abb. 8B).

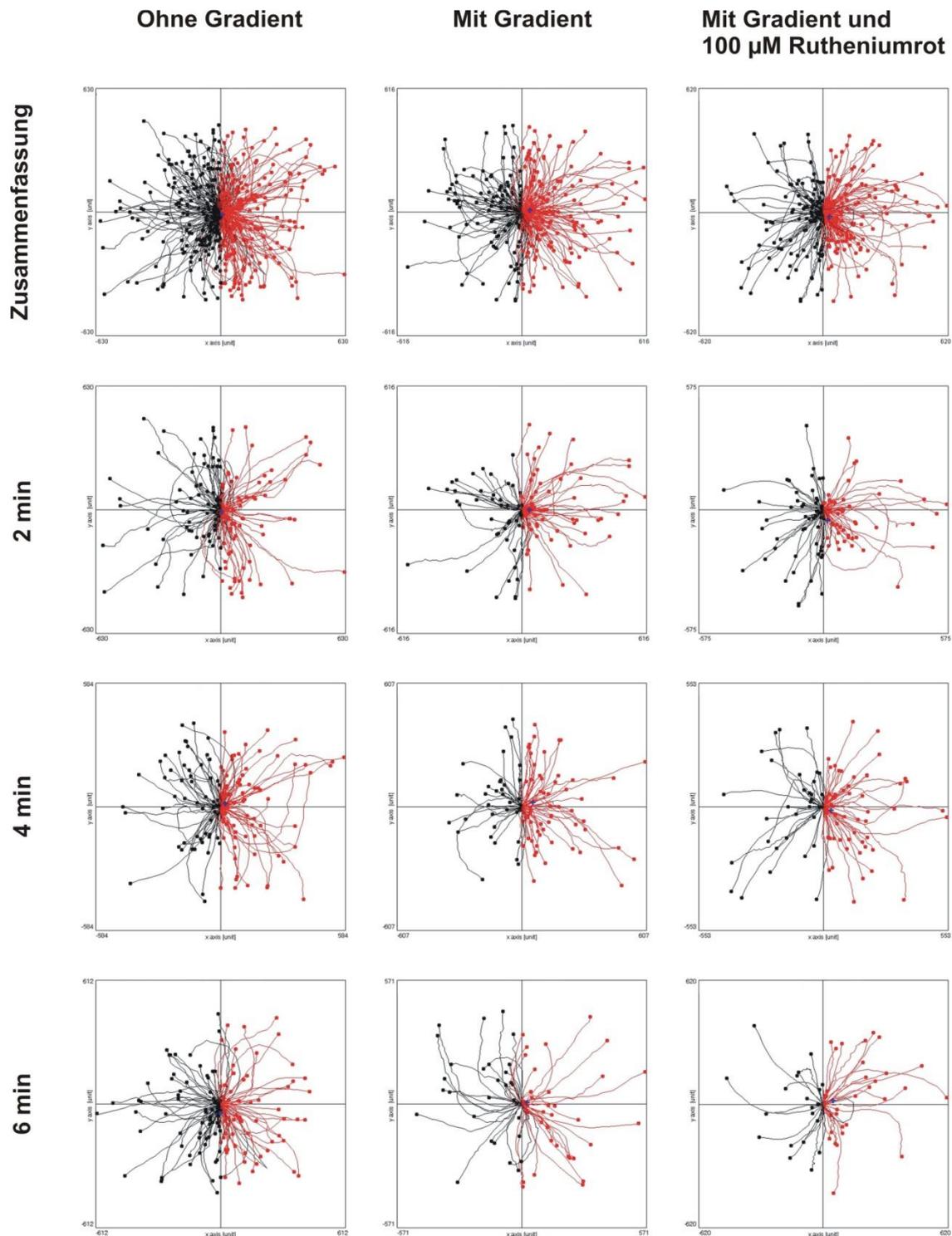


Abbildung 5A Darstellung der Migrationstrajektorien humaner Spermien in einer modifizierten Zigmond-Kammer mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie. Unter Einfluss eines Temperaturgradienten von 34 °C bis 37 °C nimmt die Anzahl der Spermienmigrationstrajektorien auf der höher temperierten Seite (rot) der Kammer zu. Nach Applikation von 100 μM des Inhibitors Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine tendenzielle Abnahme der Migrationstrajektorien humaner Spermien nachweisbar. Die Migrationstrajektorien wurden zu definierten Einzelzeitpunkten 2 min, 4 min, 6 min und ihrer graphischen Zusammenfassung abgebildet. Dargestellt sind zusammengefasste Trajektorien für drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermien von 16 unterschiedlichen Donoren untersucht.

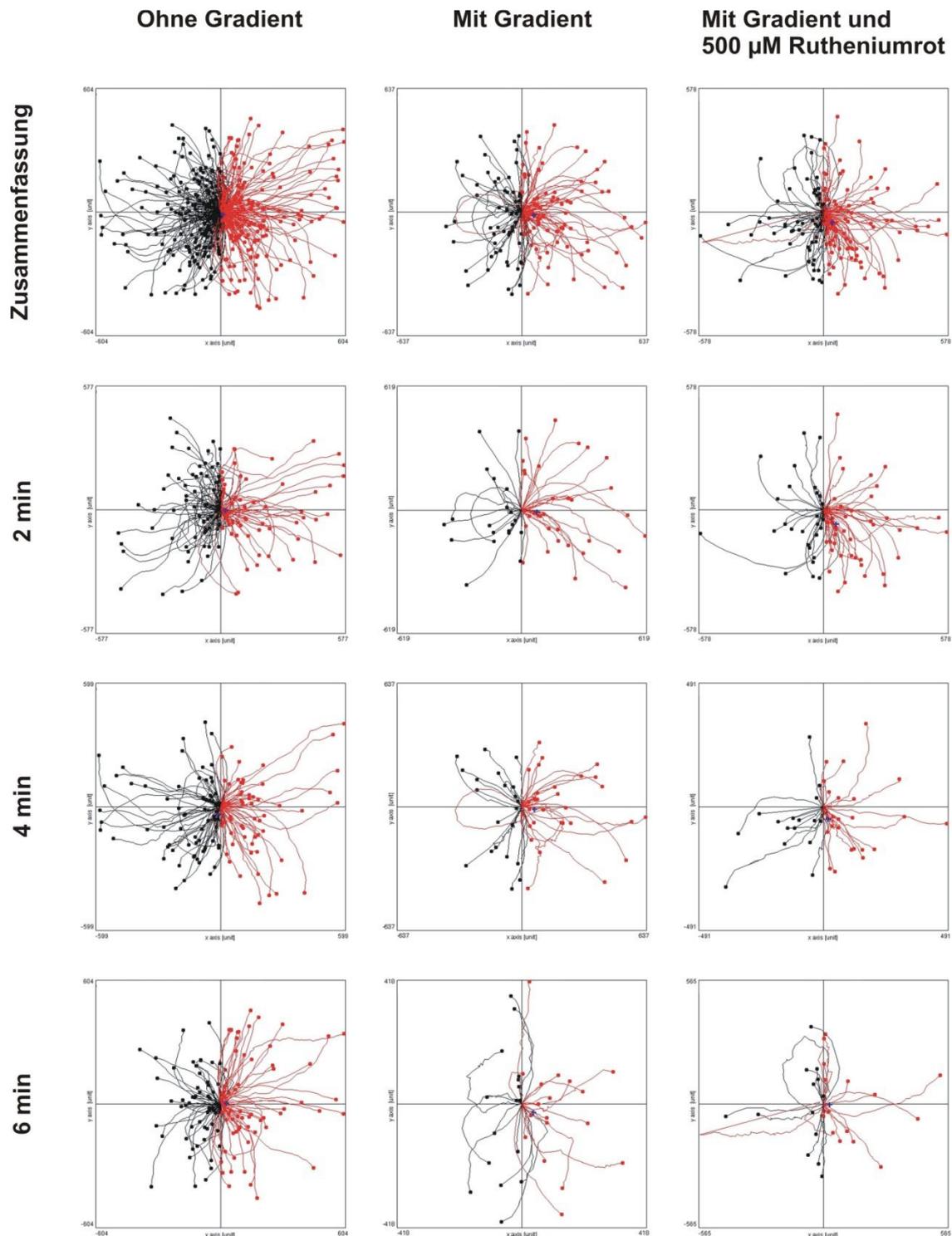


Abbildung 5B Darstellung der Migrationstrajektorien humaner Spermien in einer modifizierten Zigmond-Kammer mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie. Unter Einfluss eines Temperaturgradienten von 34 °C bis 37 °C nimmt die Anzahl der Migrationstrajektorien humaner Spermien auf der höher temperierten Kammerseite (rot,) zu. Nach Applikation von 500 μM Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine tendenzielle Abnahme der Migrationstrajektorien humaner Spermien nachweisbar. Die Migrationstrajektorien wurden zu definierten Einzelzeitpunkten 2 min, 4 min, 6 min und ihrer graphischen Zusammenfassung abgebildet. Dargestellt sind zusammengefasste Trajektorien für drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermien von 16 unterschiedlichen Donoren untersucht.

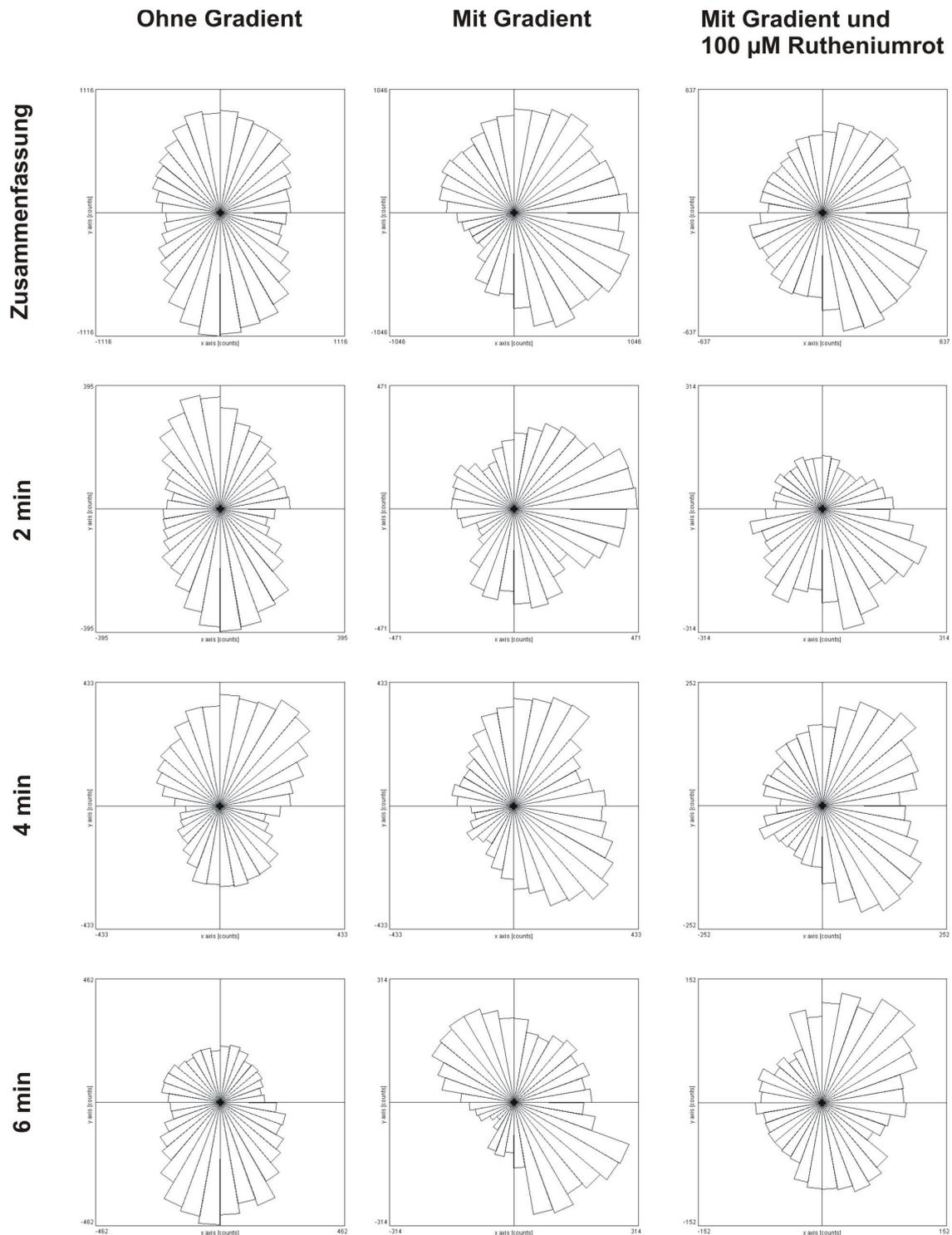


Abbildung 5C Darstellung der Hauptmigrationsvektoren humaner Spermien in einer modifizierten Zigmond-Kammer mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie (Rose plot). Unter Einfluss eines Temperaturgradienten von 34 °C bis 37 °C zeigen die Migrationstrajektorien humaner Spermien vorwiegend in Richtung der höher temperierten Kammerseite (rechts). Nach Applikation von 100 μM Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine tendenzielle Abnahme der in Richtung höher temperierter Kammerseite zeigenden Migrationstrajektorien nachweisbar. Die Migrationstrajektorien wurden zu definierten Einzelzeitpunkten 2 min, 4 min, 6 min und ihrer graphischen Zusammenfassung abgebildet. Dargestellt sind zusammengefasste Hauptmigrationsvektoren für drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermien von 16 unterschiedlichen Donoren untersucht.

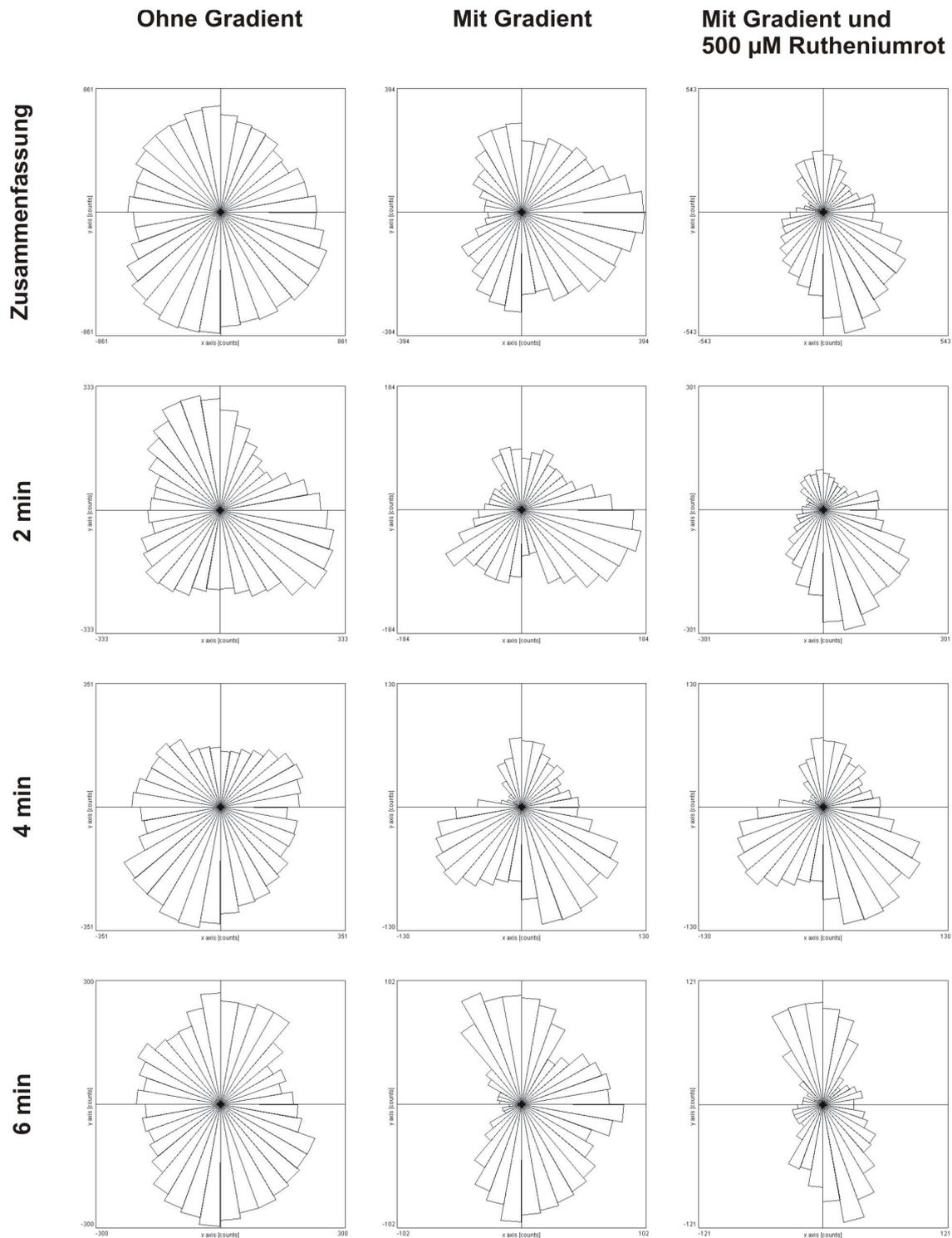


Abbildung 5D Darstellung der Hauptmigrationvektoren humaner Spermien in einer modifizierten Zigmond-Kammer mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie (Rose plot). Unter Einfluss eines Temperaturgradienten von 34 °C bis 37 °C zeigen die Migrationstrajektorien humaner Spermien vorwiegend in Richtung der höher temperierten Kammerseite (rechts). Nach Applikation von 500 μM Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine tendenzielle Abnahme der in Richtung höher temperierter Kammerseite weisenden Migrationstrajektorien nachweisbar. Die Migrationstrajektorien wurden zu definierten Einzelzeitpunkten 2 min, 4 min, 6 min und ihrer graphischen Zusammenfassung abgebildet. Dargestellt sind zusammengefasste Hauptmigrationsvektoren für drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermienproben 16 unterschiedlicher Donoren untersucht.

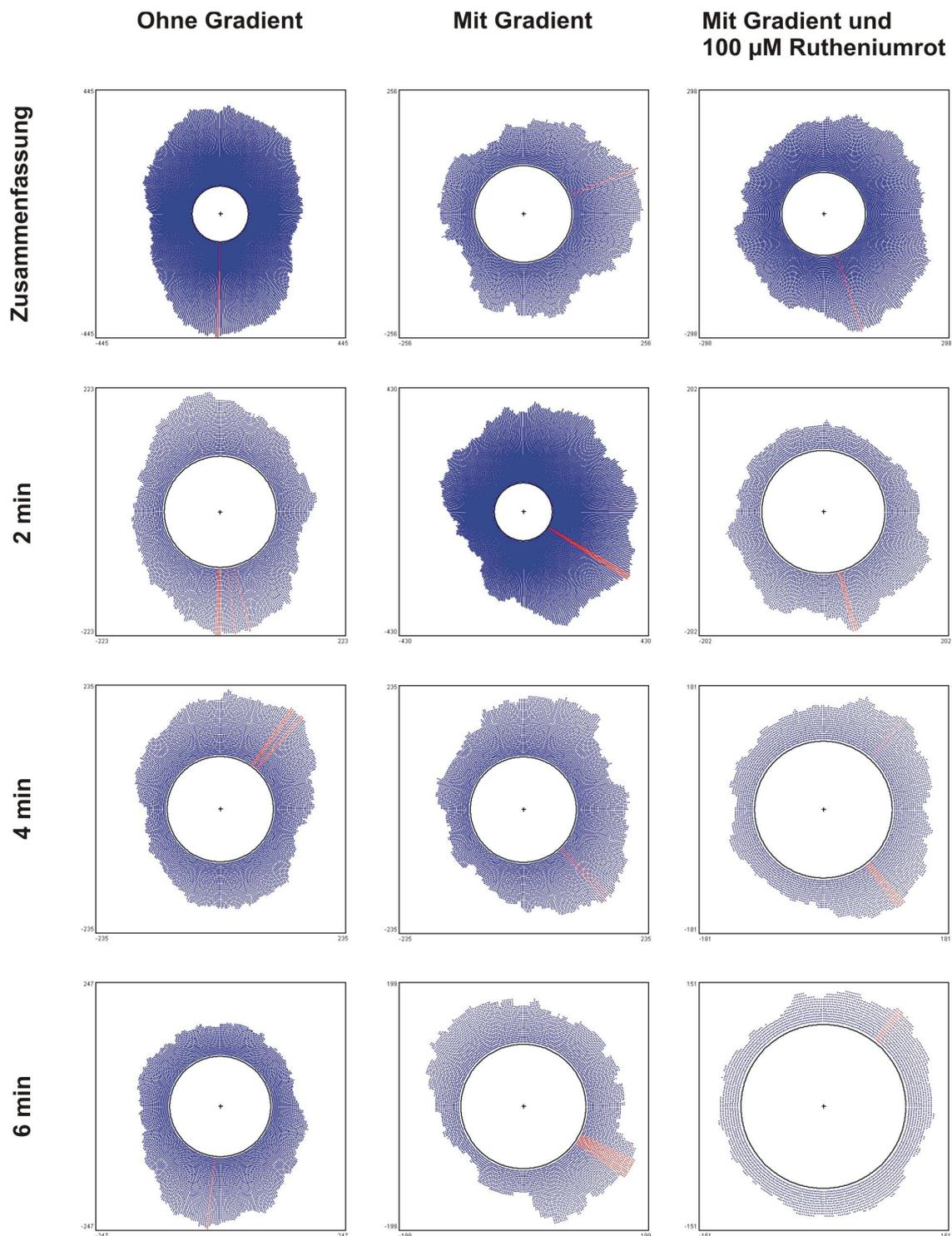


Abbildung 5E Darstellung der Migrationsvektoren humaner Spermien zirkulär vom Startpunkt der Migration aus (Circularplot) in einer modifizierten Zigmond-Kammer mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie unter Angabe des Hauptmigrationsvektors (rot). Unter Einfluss eines Temperaturgradienten von 34 °C bis 37 °C nimmt die Anzahl der Migrationstrajektorien humaner Spermien auf der höher temperierten Kammerseite (rechts) zu. Der Hauptmigrationsvektor zeigt nach rechts. Nach Applikation von 100 μM Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine tendenzielle Abnahme der Migrationstrajektorien humaner Spermien nachweisbar. Die Migrationstrajektorien wurden zu definierten Einzelzeitpunkten 2 min, 4 min, 6 min und ihrer graphischen Zusammenfassung abgebildet. Dargestellt sind zusammengefasste zirkulär angeordnete Migrationsvektoren für drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermienproben 16 unterschiedlicher Donoren untersucht.

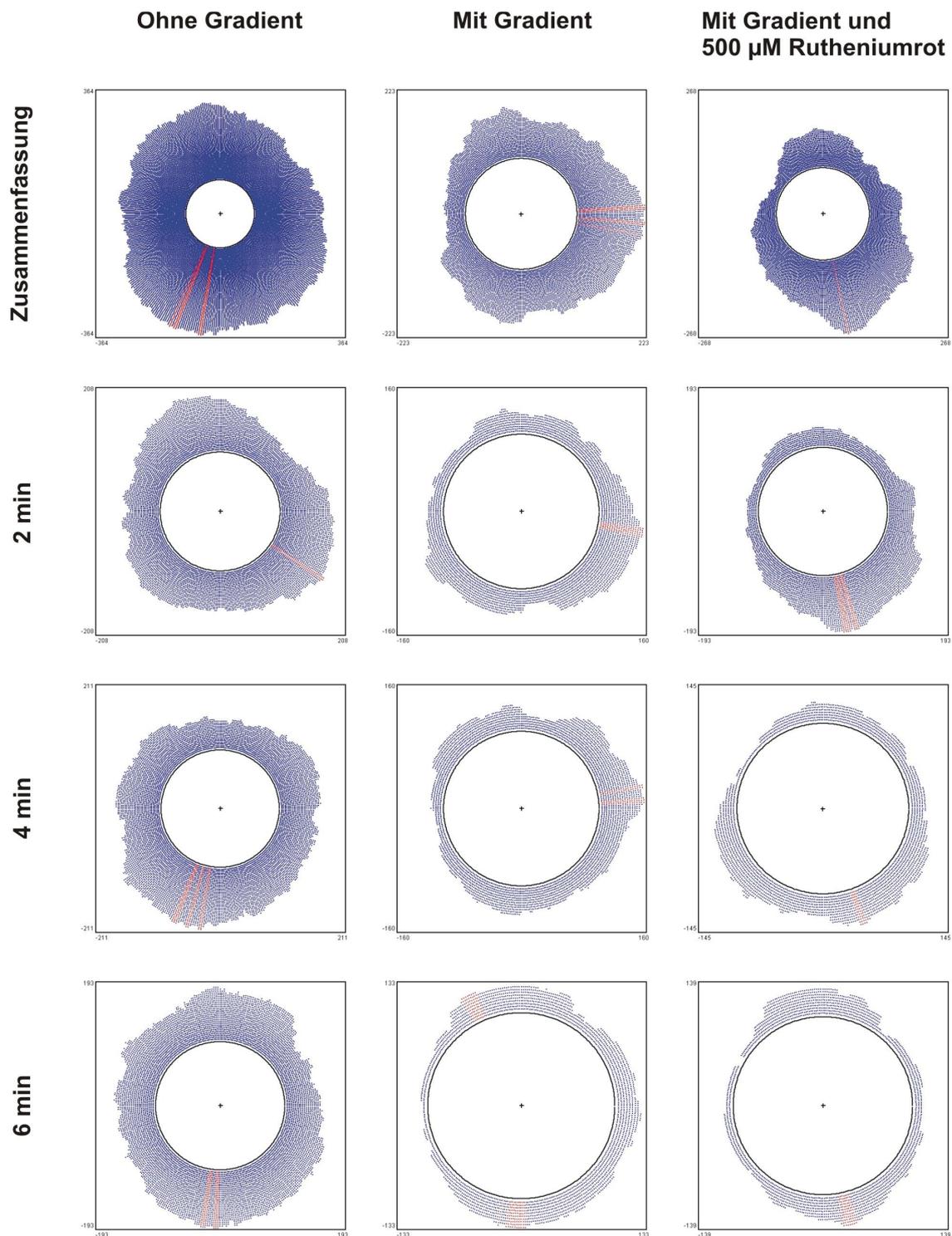


Abbildung 5F Darstellung der Migrationsvektoren humaner Spermien zirkulär vom Startpunkt der Migration aus (Circularplot) in einer modifizierten Zigmond-Kammer mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie unter Angabe des Hauptmigrationsvektors (rot). Unter Einfluss eines Temperaturgradienten von 34 °C bis 37 °C nimmt die Anzahl der Migrationstrajektoren humaner Spermien auf der höher temperierten Kammerseite (rot) zu. Der Hauptmigrationsvektor zeigt nach rechts. Nach Applikation von 500 μM Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine tendenzielle Abnahme der Migrationstrajektoren humaner Spermien nachweisbar. Die Migrationstrajektoren wurden zu definierten Einzelzeitpunkten 2 min, 4 min, 6 min und ihrer graphischen Zusammenfassung abgebildet. Dargestellt sind zusammengefasste zirkulär angeordnete Migrationsvektoren für drei unabhängige Versuche. Es wurden Spermienproben 16 unterschiedlicher Donoren untersucht.

Analysiert wurden (i) die zurückgelegte Strecke der Spermien, (ii) die ungerichtete Migration in Richtung des Temperaturgradienten und (iii) die gerichtete Migration zur höher temperierten Seite.

4.2 Analyse der Migrationsstrecke

Zu Beginn der Analyse wurde untersucht, wie sich ein Temperaturgradient auf die zurückgelegte Migrationsstrecke von Spermien auswirkt. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Im Verlauf der untersuchten Zeitspanne zeigt sich, dass unter Einfluss eines Temperaturgradienten die Migrationsstrecke der Spermien signifikant zunimmt ($P = 0,05$, Abb. 6C, D). Nach Applikation des TRPV-Antagonisten Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten lässt sich für die Konzentrationen von 100 μM (Abb. 6C, D) sowie 500 μM (Abb. 6G, H) eine tendenzielle Abnahme der zurückgelegten Migrationsstrecke der Spermien erkennen. In der zusammengefassten Darstellung der Einzelzeitpunkte zeigt der Vergleich der Bedingungen „ohne Gradient“ und „mit Temperaturgradient“ eine signifikante Distanzänderung der Spermien ($P = 0,0014$, Abb. 6A).

Nach Applikation von Rutheniumrot in Konzentrationen von 100 μM bzw. 500 μM bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine tendenzielle Abnahme der Migrationsstrecke (Abb. 6A, B) nachweisbar.

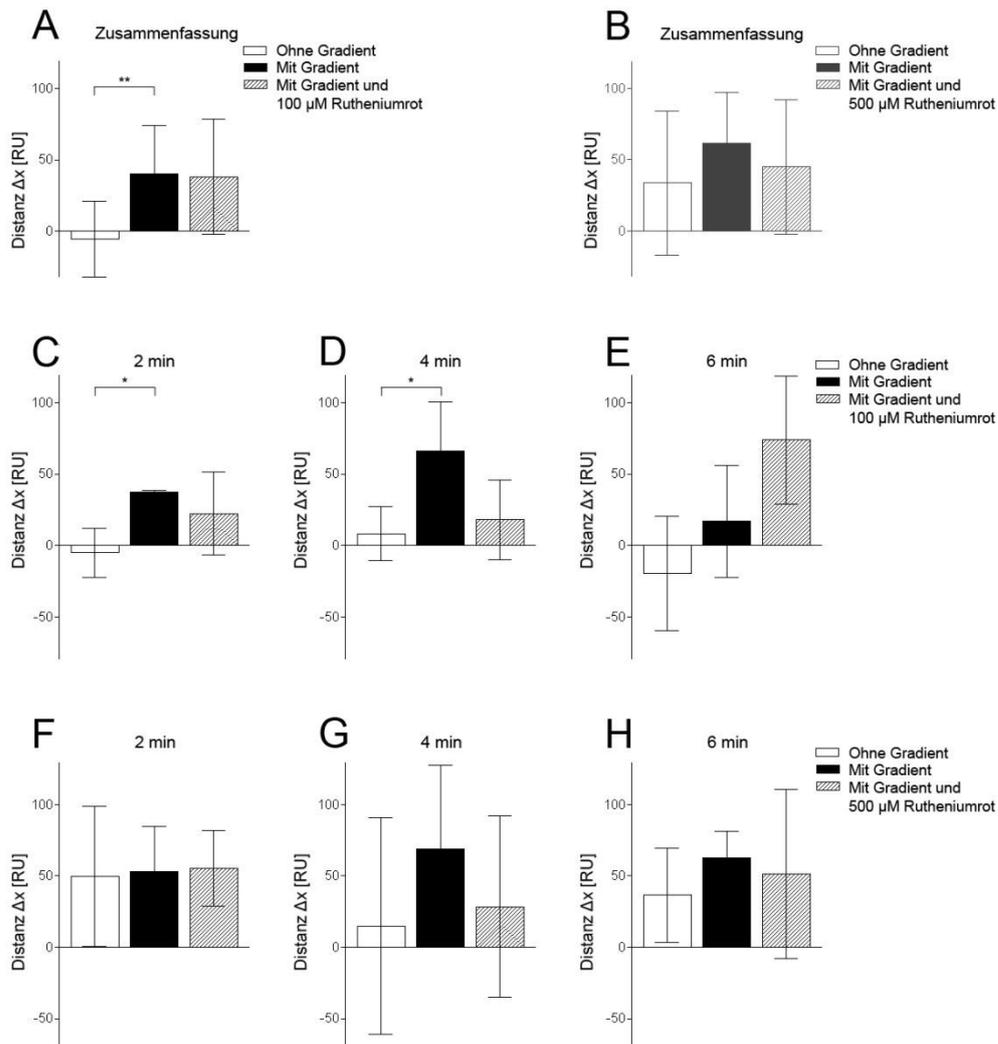


Abbildung 6 Thermotaxis-Analyse der Migrationsstrecke humaner Spermien. Unter Einfluss eines Temperaturgradienten nimmt die Migrationsstrecke humaner Spermien signifikant zu (A, C, D). Nach Applikation von Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine tendenzielle Abnahme der zurückgelegten Strecke humaner Spermien nachweisbar (B, C, D, G, H). Die Auswertung der zurückgelegten Migrationsstrecke humaner Spermien erfolgte zu definierten Einzelzeitpunkten 2 min (C, F), 4 min (D, G) und 6 min (E, H) und ihrer graphischen Zusammenfassung (A, B) sowie unter Berücksichtigung verschiedener Konzentrationen 100 μ M (C-E) und 500 μ M (F-H) des TRPV-Antagonisten Rutheniumrot. Die Analyse der Migrationsstrecke humaner Spermien erfolgte mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie entlang eines Temperaturgradienten (34 $^{\circ}$ C bis 37 $^{\circ}$ C) in einer modifizierten Zigmond-Kammer. Auf der x-Achse ist die Migrationsstrecke der Spermien (Distanz Δx) in relativen Einheiten (RU) angegeben. Die Analyse der Migrationsstrecke erfolgte zu den Versuchsbedingungen „ohne Gradient“, „mit Gradient“ und „mit Gradient und Inhibitor“. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-U-Test* berechnet (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Es wurden Spermienproben 16 unterschiedlicher Donoren in drei unabhängigen Versuchen analysiert.

4.3 Analyse der ungerichteten Migration

Im Rahmen der Analyse der ungerichteten Migration wurde der prozentuale Anteil der Spermien untersucht, der in Richtung der wärmeren Kammerseite migriert. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Im Verlauf des untersuchten Beobachtungszeitfensters von 6 min sowie der zusammengefassten Darstellung der Einzelzeitpunkte zeigt sich, dass ein signifikanter Anteil der Spermien ($P = 0,05$, Abb. 7C; $P = 0,05$, Abb. 7H; $P = 0,0157$, Abb. 7A; $P = 0,0094$, Abb. 7B) in Richtung der wärmeren Kammerseite migriert. Dementsprechend nimmt der Anteil der Spermien, die unter Einfluss eines Temperaturgradienten migrieren, um 8,66 % von 49,52 % auf 58,18 % (Abb. 7A) bzw. um 6,91 % von 50,68 % auf 57,59 % (Abb. 7B) zu. Nach Applikation des TRPV-Inhibitors Rutheniumrot bei bestehendem Temperaturgradienten in Konzentrationen von 100 μM bzw. 500 μM lässt sich keine signifikante Änderung des Migrationsverhaltens erkennen (Abb. 7A-H).

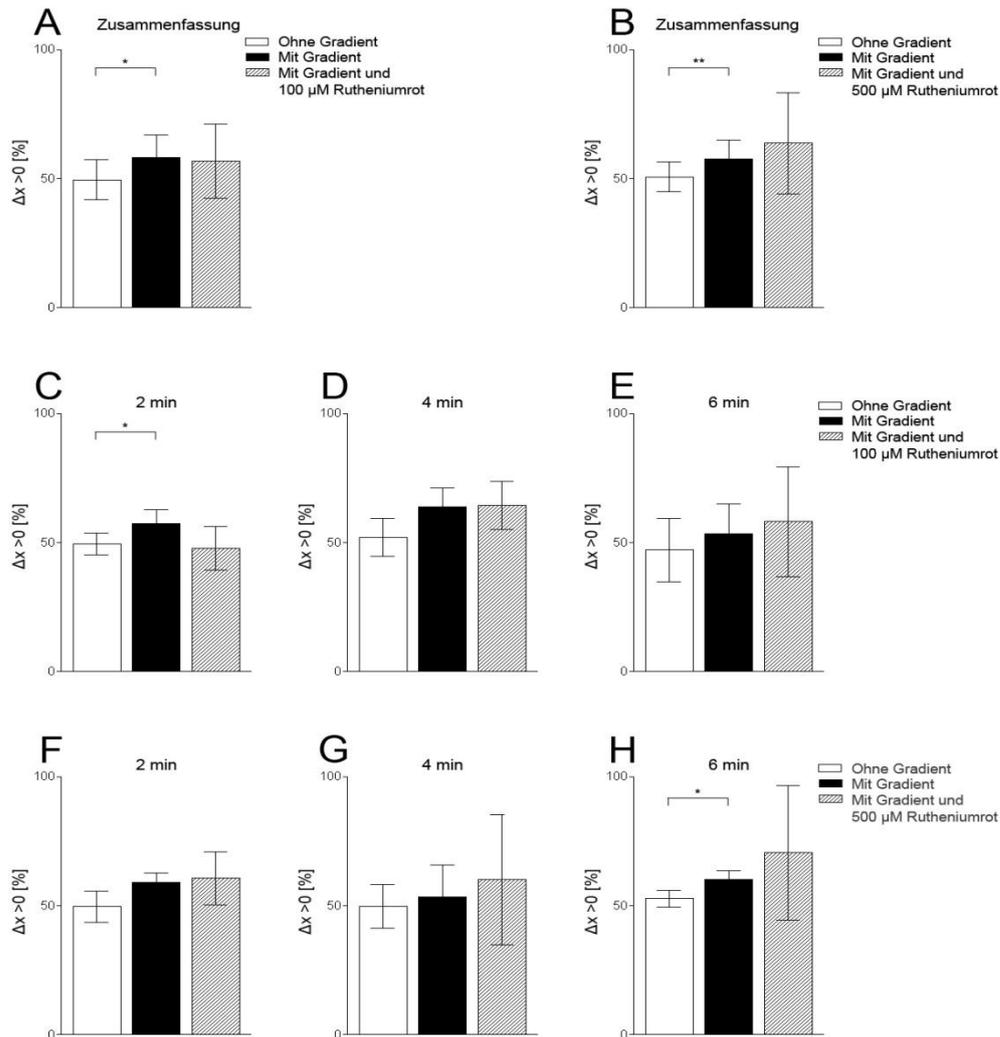


Abbildung 7 Analyse der ungerichteten Migration humaner Spermien entlang eines Temperaturgradienten. Der Anteil der Spermien, der in Richtung der höher temperierten Kammerseite migriert, nimmt im Verlauf signifikant zu (C, H). Nach Applikation von Rutheniumrot ist keine signifikante Änderung des Migrationsverhaltens nachweisbar. Die Auswertung der ungerichteten Migration humaner Spermien erfolgte zu definierten Einzelzeitpunkten 2 min (C, F), 4 min (D, G) und 6 min (E, H) und ihrer graphischen Zusammenfassung (A, B) sowie unter Berücksichtigung verschiedener Konzentrationen 100 µM (C-E) und 500 µM (F-H) des TRPV-Antagonisten Rutheniumrot. Die Analyse der ungerichteten Migration humaner Spermien erfolgte mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie entlang eines Temperaturgradienten (34 °C bis 37 °C) in einer modifizierten Zigmond-Kammer. Auf der x-Achse ist der prozentuale Anteil der Spermien dargestellt, die in Richtung der höher temperierten Kammerseite migrieren ($\Delta x > 0$). Die Analyse der ungerichteten Migration erfolgte zu den Versuchsbedingungen „ohne Gradient“, „mit Gradient“ und „mit Gradient und Inhibitor“. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-U-Test* berechnet (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Es wurden Spermienproben 16 unterschiedlicher Donoren in drei unabhängigen Versuchen analysiert.

4.4 Analyse der gerichteten Migration

Im Unterschied zu der ungerichteten Migration werden bei der Analyse der gerichteten Migration entlang des Gradienten nur die Zellen betrachtet, die auf der x-Achse im Verhältnis zur y-Achse eine längere Strecke in Gradientenrichtung zurücklegen als auf der y-Achse. Die gerichtete Migration der Spermien in Richtung des Temperaturgradienten nimmt im zeitlichen Verlauf von 6 min tendenziell zu (Abb. 8C, D, F, G, H). Zur Berechnung der Signifikanz wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Eine signifikante Zunahme der Spermienmigration um 7,21 % von 15,41 % auf 22,62 % zur höher temperierten Kammerseite unter Einfluss des Temperaturgradienten zeigt sich zum Zeitpunkt 6 min ($P = 0,05$, Abb. 8E). In der zusammengefassten Darstellung der Einzelzeitpunkte zeigt sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der gerichteten Spermienmigration in Richtung des Gradienten (Abb. 8A, $P = 0,0020$; Abb. 8B, $P = 0,0094$). Dementsprechend nimmt der prozentuale Anteil der Spermien, die gerichtet unter Einfluss des Temperaturgradienten migrieren, um 9,17 % von 19,67 % auf 28,84 % (Abb. 8A) bzw. um 12,44 % von 26,34 % auf 38,78 % (Abb. 8B) zu. Nach Applikation von Rutheniumrot (500 μM) bei bestehendem Temperaturgradienten ist eine signifikante Abnahme der Spermienmigration um 17,57 % von 38,78 % auf 21,21 % in Richtung des Temperaturgradienten in der zusammengefassten Darstellung der Einzelzeitpunkte nachweisbar (Abb. 8B, $P = 0,0006$). Nach 2 min zeigt sich eine signifikante Reduktion des prozentualen Spermienanteils um 18,52 % von 39,99 % auf 21,47 % ($P = 0,05$, Abb. 8F). Nach 4 min ist eine signifikante Abnahme des prozentualen Spermienanteils um 17,87 % von 40,59 % auf 22,72 % ($P = 0,05$, Abb. 8G) erkennbar.

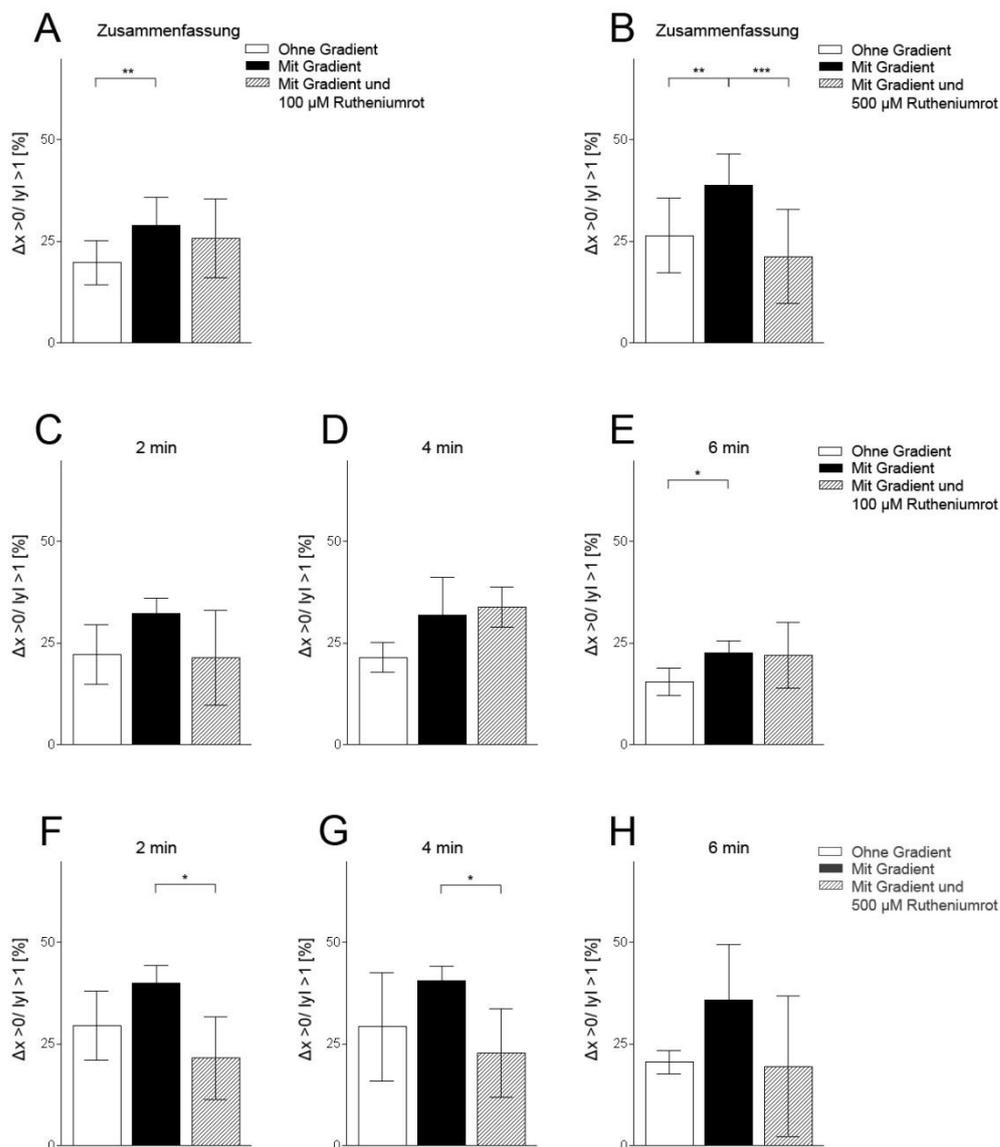


Abbildung 8 Gerichtete Migration humaner Spermien unter Einfluss eines Temperaturgradienten. Unter Einfluss eines Temperaturgradienten nimmt die Migration humaner Spermien in Richtung der höher temperierten Kammerseite signifikant zu (A, B, E). Die Applikation des TRPV-Antagonisten Rutheniumrot bei bestehendem Gradienten bewirkt eine signifikante Abnahme der Spermienmigration in Richtung des Temperaturgradienten (B, F, G). Die Auswertung der gerichteten Migration humaner Spermien erfolgte zu definierten Einzelzeitpunkten 2 min (C, F), 4 min (D, G) und 6 min (E, H) und ihrer graphischen Zusammenfassung verschiedener Konzentrationen 100 μM (C-E) und 500 μM (F-H) des TRPV-Antagonisten Rutheniumrot. Die Analyse der gerichteten Migration humaner Spermien erfolgte mit Hilfe der *Time-lapse*-Video-Mikroskopie entlang eines Temperaturgradienten (34 $^{\circ}\text{C}$ bis 37 $^{\circ}\text{C}$) in einer modifizierten Zigmond-Kammer. Die x-Achse stellt den prozentualen Anteil der Spermien dar, die eine weitere Strecke in Richtung des Temperaturgradienten zurücklegen als in die zum Gradienten orthogonal verlaufende Richtung (y-Achse). Die Analyse der gerichteten Migration erfolgte zu den Versuchsbedingungen „ohne Gradient“, „mit Gradient“ und „mit Gradient und Inhibitor“. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen wurden mit dem *Mann-Whitney-U*-

Test berechnet (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Es wurden Spermienproben 16 unterschiedlicher Donoren in drei unabhängigen Versuchen analysiert

4.5 TRPV-Genexpressionsprofil

In den vorangegangenen Migrations-Assays konnte gezeigt werden, dass der unselektive TRPV-Antagonist Rutheniumrot die Thermotaxis humaner Spermien bis zu einem gewissen Grad zu beeinflussen vermag. Um nun das TRPV-Expressionsprofil menschlicher Spermien näher zu charakterisieren, wurden Spermien im Vergleich zu anderen humanen Zelllinien (primäre epidermale Keratinozyten, Keratinozyten der Zelllinie HaCaT, Normale Humane Dermale Fibroblasten (NHDF), Hepatozyten (Hep G2ISO), embryonales Nierenzellepithel (Hek 293), Zervixkarzinomepithel der Zelllinie HeLa, dermale mikrovaskuläre Blutendothelzellen (BEC), Adenokarzinom-Enterozyten des Colons (CaCo)), für die eine *TRPV*-Expression bereits bekannt ist, mittels quantitativer *real-time PCR* auf die Expression von *TRPV* untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *TRPV1*, *TRPV2*, *TRPV3* und *TRPV4* von humanen Spermien exprimiert werden (Abb. 9A). Das Gen *TRPV1* wird, gefolgt von *TRPV4*, *TRPV2* und *TRPV3*, von Spermien am stärksten exprimiert. *TRPV1* wird von den zur Kontrolle herangezogenen Zelllinien am stärksten von Keratinozyten exprimiert (Abb. 9B). PBMCs weisen die geringste *TRPV1*-Expression auf (Abb. 9B). *TRPV2* wird vor allem von NHDF und PBMCs exprimiert (Abb. 9C). Bei der Zelllinie HeLa und Keratinozyten ist die *TRPV2*-Expression gering (Abb. 9C). *TRPV3* wird hauptsächlich von Keratinozyten und der Zelllinie CaCo exprimiert (Abb. 9D). Die *TRPV3*-Expression der Zelllinie HeLa ist im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien am geringsten (Abb. 9D). Eine deutliche Expression von *TRPV4* zeigt sich bei den Zelllinien BEC und Hek (Abb. 9E). Die Zelllinie Hep G2ISO zeigt eine schwache *TRPV4*-Expression (Abb. 9E).

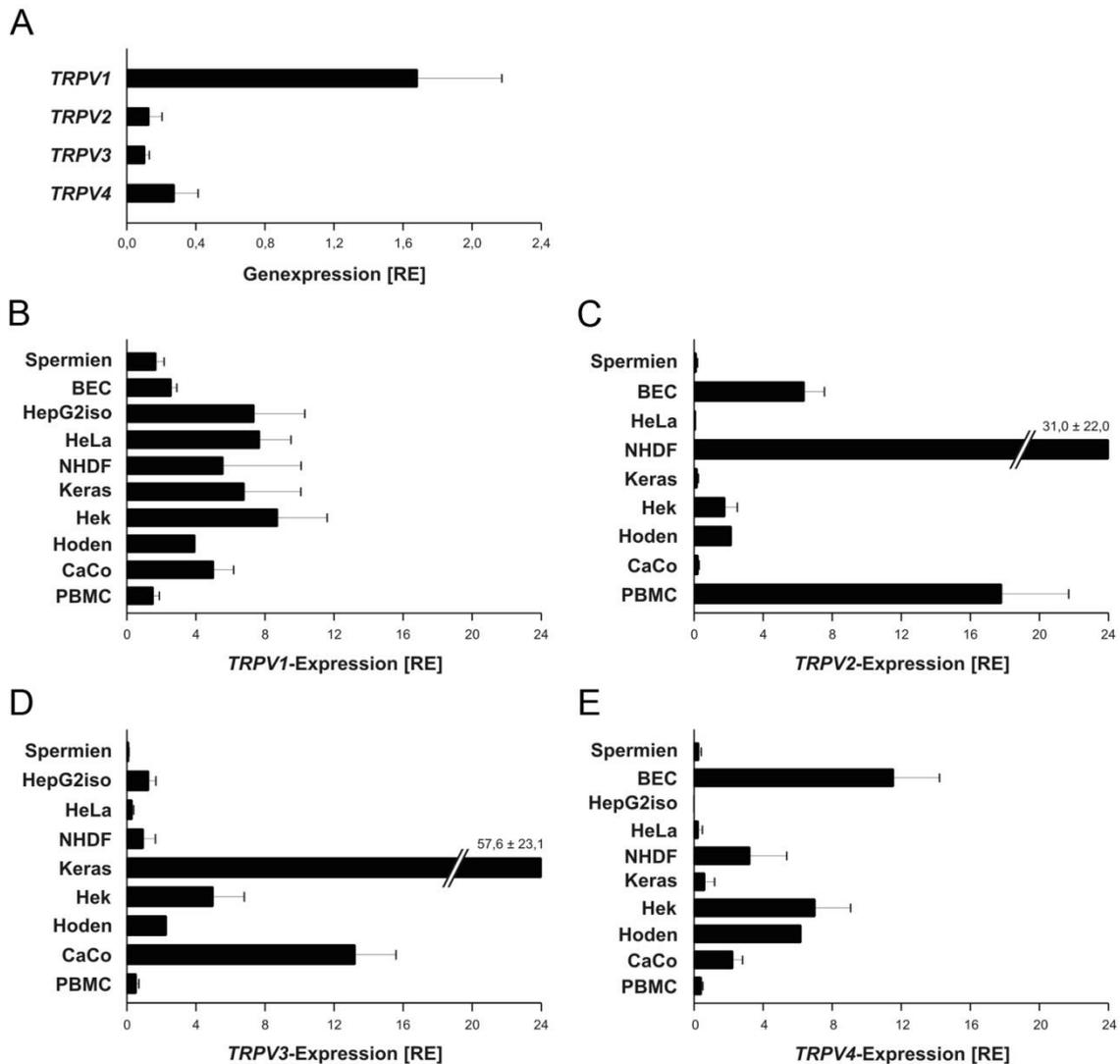


Abbildung 9 Quantitative *real-time* PCR-Analyse der *TRPV1* (n=5)-, *TRPV2* (n=4)-, *TRPV3* (n=4)- und *TRPV4*-Expression (n=10) von humanen Spermien (n=5 unterschiedliche Donoren) (A) und von verschiedenen Zelllinien (Keratinocyten (n=10), BEC (n=6), Hepatozyten (n=6), HeLa (n=4), NHDF (n=6), Hek (n=5), Hoden (n=1), CaCo (n=5)) und PBMCs (n=5). *TRPV1* (B)-, *TRPV2* (C)-, *TRPV3* (D)- und *TRPV4*-Expression (E) auf oben genannten Zelllinien.

Die relative Expression der Zielgene ist im Vergleich zur Expression der 18S RNA ± Standardabweichung in relativen Einheiten (RE) dargestellt.

4.6 TRPV-Proteinexpressionsprofil

4.6.1 Durchflusszytometrische Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TRPV-Proteinexpressionsprofil auf Spermien mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die durchflusszytometrische Analyse zeigt eine deutliche Expression von TRPV1, TRPV3 und TRPV4 auf humanen Spermien (Abb. 10). Spermien weisen hierbei einen quantitativen Unterschied des TRPV-Expressionsmusters auf. Bei allen untersuchten Probanden dominiert die Expression von TRPV1, gefolgt von TRPV4 und TRPV3. Der durchschnittliche prozentuelle Anteil aller analysierten Ereignisse liegt für TRPV1 bei 20,26 %, für TRPV4 bei 12,98 % und für TRPV3 bei 7,51% (Tab. 6). Neben Unterschieden in der Expressionsstärke der drei Rezeptoren, zeigt sich außerdem eine Variabilität in der Ausprägung der Expression der einzelnen TRPV-Subtypen zwischen den sechs untersuchten Donoren (Abb. 10). Diese ist, abgesehen von einem Ausreisser, für TRPV3 allerdings sehr gering.

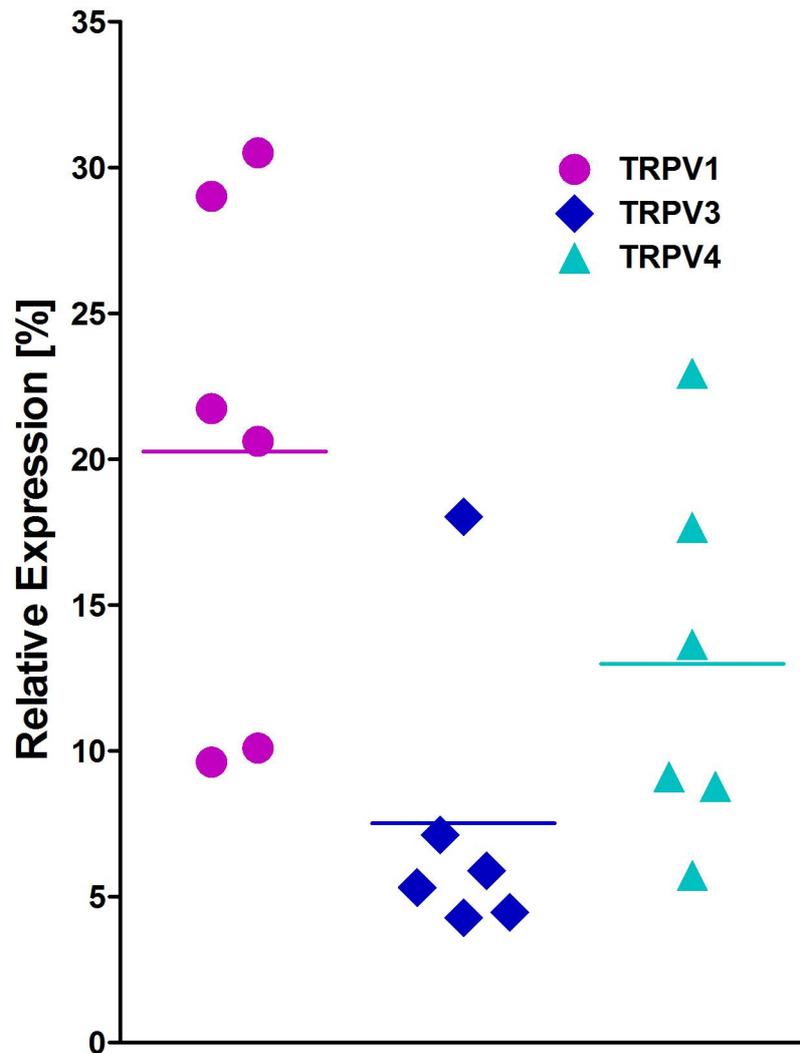


Abbildung 10 Durchflusszytometrische Auswertung des TRPV-Rezeptorprofils humaner Spermien. Die Expression von TRPV1 dominiert bei allen Donoren, gefolgt von TRPV4 und TRPV3. Die relative Expression der TRPV-Subtypen TRPV1, TRPV3 und TRPV4 wird repräsentativ für sechs unterschiedliche Donoren in Prozent dargestellt.

Probe	TRPV1 %	TRPV3 %	TRPV4 %
Proband 1	10,09	5,31	5,73
Proband 2	20,61	4,28	9,12
Proband 3	30,5	18,02	22,94
Proband 4	29,01	4,46	17,66
Proband 5	9,61	5,89	8,78
Proband 6	21,73	7,12	13,65
Mittelwert	20,26	7,51	12,98
Standardabweichung	8,95	5,25	6,43

Tabelle 6 Prozentueller Anteil der TRPV-Proteinexpression von humanen Spermien bei 6 unterschiedlichen Probanden.

4.6.2 Immunfluoreszenzanalyse

In einem nächsten Schritt wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen das TRPV-Proteinexpressionsprofil analysiert, um die mikroanatomische Lokalisation von TRPV auf humanen Spermien näher zur untersuchen.

Die Analyse des TRPV-Proteinexpressionsprofil zeigt eine deutliche Expression von TRPV1, TRPV3 und TRPV4 auf Spermien im Bereich des Mittelstücks und des Flagellums (Abb. 11).

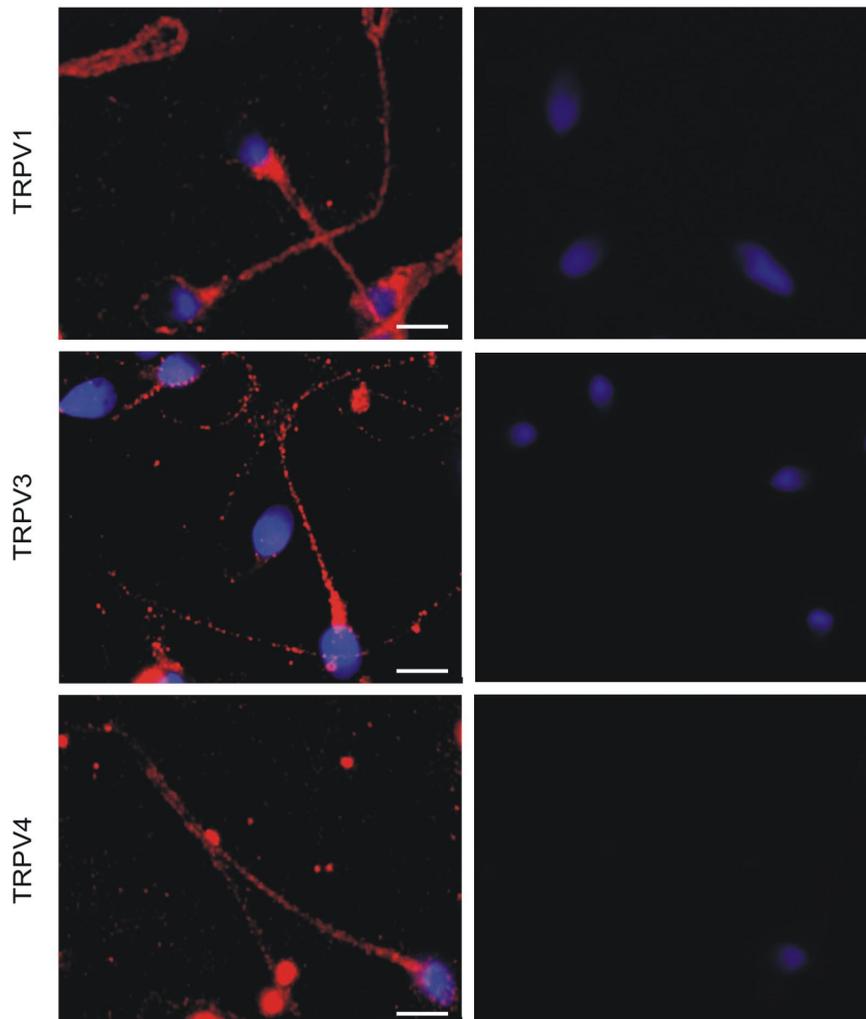


Abbildung 11 TRPV-Proteinexpression auf humanen Spermien. Die Darstellung der Immunfluoreszenzanalyse zeigt eine deutliche Expression von TRPV1, TRPV3 und TRPV4 auf humanen Spermien. Die TRPV-Rezeptoren sind im Bereich des

Mittelstücks und des Flagellums lokalisiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit spezifischen Antikörpern gegen TRPV1, TRPV3 und TRPV4 und rot-fluoreszierendem Sekundärantikörper (NL557 Donkey anti-rabbit-IgG) bei drei verschiedenen Spendern (n=3) durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Färbungen eines Spenders. Die Balkenlänge entspricht 5 μm .

5 Diskussion

Für die Migration durch den weiblichen Genitaltrakt vom Ort der Ejakulation in der Vagina zum Ort der Fertilisation im Eileiter nutzen menschliche Spermien verschiedene Navigations- und Migrationsmechanismen. Von der Vagina in das *Cavum uteri* wandern Spermien durch aktive Schwimmbewegungen. Der Junktionsbereich zur Tube dient dann als sogenanntes Spermienreservoir (Pacey, Davies et al. 1995, Pacey, Hill et al. 1995, Baillie, Pacey et al. 1997, Reeve, Ledger et al. 2003, Suarez and Pacey 2006). Von hier erfolgt nach dem Prozess der Kapazitation eine gerichtete Migration der Spermien mittels Thermotaxis (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003, Bahat and Eisenbach 2006) und/oder Chemotaxis (Sun, Bahat et al. 2005). Thermotaxis wird als führender Navigationsmechanismus für die Migration der Spermien über die längere Strecke zwischen Uterusisthmus und *Tuba uterina* propagiert (Bahat and Eisenbach 2006). Von dort wird das Spermium durch die Tube zum Ort der Fertilisation geleitet, an dem die gerichtete Migration dann entlang eines Chemokingradienten auf kurzer Distanz in unmittelbarer Nähe zur Eizelle erfolgt (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003, Sun, Bahat et al. 2005).

Physiologische bzw. anatomische Voraussetzung einer Thermotaxis im weiblichen Genitaltrakt ist die Etablierung eines Temperaturgradienten. Bisherige Arbeiten führten zu der Erkenntnis, dass die Temperaturunterschiede innerhalb des Eileiters speziesabhängig variieren: bei Schweinen wurde eine Differenz von 0,7 °C zwischen kaudalem Isthmus und kranialer Ampulle (Hunter and Nichol 1986) beobachtet. Bei Kaninchen besteht eine Temperaturdifferenz von 2 °C (David, Vilensky et al. 1971) zwischen Isthmus und Ampullenbereich. (David, Vilensky et al. 1971). Hierbei zeigt sich ein Temperaturabfall auf der Seite des funktionellen Spermienreservoirs im Isthmusbereich (Bahat, Eisenbach et al. 2005). Auch im menschlichen weiblichen Genitaltrakt ist die Temperatur nicht in allen Bereichen konstant. Die Arbeitsgruppe Cicinelli et al. 2004 konnte zeigen, dass die Temperatur vom Tuben-Isthmus in Richtung *Cavum uteri* zum Zeitpunkt der Ovulation abfällt (Cicinelli, Einer-Jensen et al. 2004). Es werden diesbezüglich drei verschiedene Hypothesen diskutiert: (i) eine steroidhormonabhängige Produktion (Gandolfi 1995) eines Glykoproteins im sauren Mucus, welches auf Seiten des Reservoirs sezerniert wird, einer endothermaler Hydratation unterliegt (Jansen and Bajpai 1982) und auf diese

Weise bei der Ovulation eine Abkühlung der dort umgebenden fluiden Substanz (Luck, Griffiths et al. 2001) bewirkt. (ii) Ein Gegenstromprinzip, wobei das Blut aus der *V. ovarica* das Blut kühlt, welches die Reservoirseite speist (David, Vilensky et al. 1971, Hunter and Nichol 1986) sowie zwei Arterien, die Isthmus und Ampulle versorgen, jedoch in der Nähe der *V. ovarica* eine Anastomose bilden, wo das Blut in die entgegengesetzte Richtung strömt (Leese 1988). (iii) Die Veränderung in der Blutversorgung bei Frauen zum Zeitpunkt der Ovulation: Der Blutfluss wechselt von der wärmeren *A. ovarica* vor der Ovulation auf die kältere *A. uterina* infolge der Ovulation, wobei letztere durch kühleres Blut aus dem Bereich der Vagina gespeist wird (Cicinelli, Einer-Jensen et al. 2004). Erkenntnisse zur Ovulations-abhängigen Existenz eines Temperaturgradienten sind jedoch *in vivo* noch nicht ausreichend untersucht. Es ist darüber hinaus auch nicht geklärt, auf welchen Temperaturgrenzbereich sich ein solcher Gradient im weiblichen Genitaltrakt beschränken würde (Bahat and Eisenbach 2006).

Auch auf zelluläre bzw. molekulare Ebene, ist der Prozess der Thermotaxis von Spermien bis heute nicht im Detail aufgeklärt. In diesem Kontext sollen zunächst die verschiedenen Prozesse der Spermienakkumulation definiert werden: Analog zu Chemotaxis, Chemokinesis und „Chemotrapping“ definiert Thermotaxis eine gradient-abhängige Migration einer Zelle in Richtung des jeweiligen Temperaturgradienten (Eisenbach 1999), während Thermokinese die Fähigkeit einer Zelle beschreibt, sich bei Temperaturänderungen aktiver/schneller zu bewegen (Eisenbach and Giojalas 2006). „Trapping“ schließlich definiert eine Akkumulation von Zellen an ein einem bestimmten Ort als Folge einer veränderten Migrationsgeschwindigkeit (Eisenbach 1999). Dies hängt möglicherweise von einer Wirkung eines Stimulus auf die Motilität ab sowie von Gradient-unabhängigen Veränderungen des Schwimmverhaltens auf eine bestimmte Stimulus-Konzentration (Eisenbach 1999). Auch andere Faktoren wie z.B. die Adsorption einer Zelle an einer Kapillare oder die Kombination der genannten Faktoren können Einfluss auf eine Zellakkumulation nehmen (Eisenbach 1999).

Verfahren zur Messung zellulären Migrationsverhaltens werden unter anderem anhand ihrer Möglichkeiten zwischen den Prozessen der Spermienakkumulation zu differenzieren bewertet. Es werden vier verschiedene

Kategorien von Analyseverfahren zur Beurteilung der Spermienmigration unterschieden (Eisenbach 1999): Die erste Gruppe beinhaltet quantitative Verfahren, die die Spermienmigration entlang eines ansteigenden Chemokingradienten messen (Eisenbach 1999, Eisenbach and Tur-Kaspa 1999). Ein Beispiel dafür ist der *Capillary-Assay*, bei dem eine Kapillare, die das Test-Substrat enthält, in ein Reservoir mit darin befindlicher Spermien suspension eingebettet wird (Ralt, Manor et al. 1994). Nach Ablauf einer definierten Inkubationszeit wird die Zahl der in die Kapillare migrierten Spermien quantifiziert. Der Nachteil dieses rein quantitativen Verfahrens besteht darin, dass nicht zwischen Chemotaxis, Chemokinese und „*Trapping*“ differenziert werden kann (Iqbal, Shivaji et al. 1980, Gnessi, Ruff et al. 1985, Ralt, Goldenberg et al. 1991, Cohen-Dayag, Ralt et al. 1994, Lee, Kao et al. 1994, Ralt, Manor et al. 1994, Anderson, Feathergill et al. 1995). Ein Beispiel für ein rein quantitatives Verfahren zur Analyse der Spermienmigration im Kontext thermischer Stimuli beschreibt eine Arbeit von Bahat et al. 2009. Hierbei wurde ein Thermotaxis-Assay mit einer „Thermoseparationskammer“ etabliert, welcher aus einer elektrisch gesteuerten Einheit zur Aufrechterhaltung eines Temperaturgradienten von 33 °C – 37 °C und einer sogenannten „*Lucite tube*“ (Bahat and Eisenbach 2009) mit zwei, durch eine Trennwand mit durchlässigen Poren für die Spermien geteilten Kompartimenten besteht. In eine der Kammern wurden kapazitierte humane Spermien in einer Konzentration von 5×10^6 bis 20×10^6 Zellen/ml appliziert. Dann wurde die *Lucite tube* für 15 min unter Aufrechterhaltung des Thermogradienten inkubiert und im Anschluss wurde mit einem Hemacytometer die Anzahl der Spermien gezählt, die entlang des Gradienten auf die wärmere Seite der Kammer migriert waren (Bahat and Eisenbach 2009). Als negative Kontrolle wurde der Migrationsassay ohne Temperaturgradienten bei 37 °C in beiden Kompartimenten wiederholt.

Die zweite Gruppe umfasst Assays, die Spermienmigration entlang eines abfallenden Chemokingradienten messen. Hierbei ist das Spermienreservoir mit dem Test-Substrat befüllt. Das Reservoir ist mit einer Kapillare verbunden, die entweder das Kontrollmedium oder ebenfalls das Test-Substrat beinhaltet. Im Falle des Kontrollmediums reagieren Spermien auf eine abfallende Konzentration des Test-Substrats und zeigen somit eine verminderte Migration

und letztlich Akkumulation in der Kapillare. Der Vorteil dieses Migrations-Assays besteht darin, zwischen Chemotaxis und Chemokinese sowie zwischen Chemotaxis und „*Trapping*“ zu unterscheiden (Zamir, Riven-Kreitman et al. 1993, Ralt, Manor et al. 1994): Die Existenz eines Chemokingradienten definiert den Prozess der Chemotaxis. In dem beschriebenen Assay wird nur dann ein (negativer) Gradient aufgebaut, wenn die Kapillare, die mit dem Reservoir verbunden ist, das Kontrollmedium enthält. Die Migration vom Spermienreservoir in Richtung der Kapillare ist also reduziert. Wenn die Kapillare jedoch ebenfalls das Test-Substrat enthält, wird kein Chemokingradient aufgebaut und Spermien verteilen sich gleichsam in Kapillare und Reservoir. Chemokinese hingegen ist unabhängig von der Richtung des Gradienten und definiert lediglich eine in Abhängigkeit von der Chemokinkonzentration erhöhte durchschnittliche Geschwindigkeit der migrierenden Spermien, nicht jedoch eine Änderung der Migrationsrichtung. „*Trapping*“ schließlich resultiert aus einer Akkumulation von Zellen an einem bestimmten Ort aufgrund einer verminderten durchschnittlichen Geschwindigkeit (Eisenbach et al. 1999a). Im Falle der Chemokinese würde sich also bei der Untersuchung des Test-Substrats eine erhöhte, im Falle des „*Trapping*“ eine relativ verminderte Akkumulation pro Zeit beobachten lassen.

Die dritte Kategorie der Migrationsanalyse-Verfahren beinhaltet sogenannte *Choice-Assays*. Sie bestehen aus einem Zwei-Kammer-System, bei dem die Spermien die Möglichkeit haben, zwischen der Kammer zu „wählen“, die ein Test-Substrat enthält oder der Kammer, die das jeweilige Kontrollmedium enthält. Es gibt verschiedene Zwei-Kammer-Systeme bzw. Mehr-Kammer-Systeme für den mikroskopischen oder makroskopischen Messbereich, denen dieses Prinzip zugrunde liegt (Eisenbach 1999). Anhand dieser Methode ist es möglich, zwischen Chemotaxis und Chemokinese zu differenzieren. Dies erfolgt wiederum in Abhängigkeit von der Existenz eines Chemokingradienten und der daraus resultierenden Richtungsänderung der Migration. Ist das Testsubstrat in einer der Kammern, so entsteht ein Chemokingradient in Richtung der Kammer, in der sich die Spermien befinden. Diese nehmen den Gradienten wahr und migrieren in Richtung Testsubstrat. Allerdings kann man mit diesen *Choice-Assays* nicht zwischen Chemotaxis und „*Trapping*“ unterscheiden (Zamir, Skofitsch et al. 1986, Villanueva-Diaz, Vadillo-Ortega et al. 1990, Makler,

Reichler et al. 1992, Villanueva-Diaz, Arias-Martinez et al. 1992, Sliwa 1993, Sliwa 1993, Cohen-Dayag, Ralt et al. 1994, Ralt, Manor et al. 1994, Sliwa 1994, Makler, Stoller et al. 1995, Sliwa 1995, Villanueva-Diaz, Arias-Martinez et al. 1995, Jaiswal, Tur-Kaspa et al. 1999).

Die vierte Gruppe der Chemotaxis-Analyseverfahren wird durch Systeme gebildet, die auf dem Prinzip basieren, Spermientrajektoren zu folgen. *Tracking-Assays* ermöglichen eine differenzierte Migrationsanalyse und differenzieren zwischen Chemotaxis und anderen Akkumulationsursachen (Ralt, Manor et al. 1994, Giojalas and Rovasio 1998, Jaiswal, Tur-Kaspa et al. 1999, Oliveira, Tomasi et al. 1999). Dabei werden die gerichteten Veränderungen im Schwimmverhalten der Spermien in Gegenwart des Substratgradienten mittels Videomikroskopie aufgezeichnet. Die Spermientrajektoren dienen dazu, die Spur der Spermien zu verfolgen und sind Gegenstand der Migrationsanalyse. *Tracking-Assays* können heute als Goldstandard zur Analyse zellulärer Migration bezeichnet werden. Durch Fabro et al. wurden mathematische Formeln etabliert, die eine standardisierte Quantifizierung und Interpretation der kumulativen Trajektionen ermöglichen. So eignet sich der Parameter $(\Delta x / |\Delta y| > 1)$ besonders dazu, gerichtete Spermienmigration zu messen (Fabro, Rovasio et al. 2002), da nur Trajektionen berücksichtigt werden, die auf der x-Achse im Verhältnis zur y-Achse eine längere Strecke in Gradientenrichtung zurücklegen, als auf der y-Achse. Weitere Analyseparameter definieren $(\Delta x > 0)$ und (Δx) . Ein Störfaktor bei der computerbasierten Auswertung ist die Unterteilung der Analyse in mehrere Zeitabschnitte (Gakamsky, Schechtman et al. 2008). Diese Fragmentierung kann dazu führen, dass bestimmte Zellen, die sich am Anfang bzw. Ende des jeweiligen Auswertebereiches befinden, nicht adäquat erfasst werden.

Überträgt man die möglichen Störfaktoren der Chemotaxis-Analyse-Verfahren nun auf die Thermotaxis-Assays, so stellt sich die Frage, inwiefern sich z.B. Thermokinese auf den prozentualen Migrationseffekt der gerichteten Spermienmigration auswirkt. In diesem Kontext ist es fraglich, ob Spermien auf den Stimulus Temperatur aktiv ihre Migrationsgeschwindigkeit erhöhen können, d.h. die Fähigkeit zur Thermokinese besitzen.

Das Potential von *Tracking-Assays* zeigt sich in einer 2003 von Bahat et al. publizierten Studie zur Spermienthermotaxis im Kaninchenmodell (Bahat, Tur-

Kaspa et al. 2003, Bahat and Eisenbach 2009). Hierbei wurde mittels einer modifizierten Zigmondkammer ein Temperaturgradient von 37 °C – 39 °C etabliert und dessen Auswirkung auf die Migration von Kaninchenspermien beobachtet (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003). Videomikroskopisch dokumentierte individuelle Spermientrajektoren wurden im Hinblick auf (i) ungerichtete Migration ($\Delta x > 0$), und (ii) gerichtete Migration analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass 7 % - 17 % der Kaninchenspermien thermotaktische Antworten zeigen (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003). Da der Anteil kapazitierter Spermien mit dem Anteil thermosensibler Spermien korrelierte, wurde gefolgert, dass die Fähigkeit der Spermien zur Wahrnehmung eines Temperaturgradienten während der Kapazitation erreicht wird (Bahat, Tur-Kaspa et al. 2003, Bahat and Eisenbach 2006).

In Anlehnung an die Arbeit von Bahat et al. wurde in der vorliegenden Arbeit ein videomikroskopisches Analyseverfahren zur Evaluation humaner Spermienthermotaxis etabliert. Unsere Untersuchungen zeigen, dass humane Spermien tatsächlich gerichtet entlang eines Temperaturgradienten (34 °C - 37 °C) zur wärmeren Seite der Kammer migrieren. Die Kapazitation der Spermien in der vorliegenden Arbeit wurde durch eine einstündige Inkubation der Spermien in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) erreicht (Cohen-Dayag, Tur-Kaspa et al. 1995). Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse von Bahat et al. liegt es nahe, dass die geringen Unterschiede des Migrationsverhaltens der Spermien unter Einfluss eines Temperaturgradienten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf den Status der Kapazitation der Spermien zurückzuführen sind. Ein weiterer Aspekt, der bei der Auswertung zum Tragen kommt, ist z.B. die Tatsache, dass jedes Spermium zu einem anderen Zeitpunkt die Fähigkeit zur Kapazitation erreicht (Fabro, Rovasio et al. 2002). Die Thermosensibilität bzw. Chemosensibilität innerhalb einer Zellpopulation ist folglich zu jedem Analysezeitpunkt unterschiedlich. Demnach ist ein ständiger Wechsel zwischen den Spermien vorhanden, die bereits kapazitiert sind und solchen, die diesen Zustand noch nicht erreicht haben sowie denen, die diese Fähigkeit bereits verloren haben (Cohen-Dayag, Tur-Kaspa et al. 1995, Fabro, Rovasio et al. 2002). Bisherige Studien konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass sich der Zustand der Kapazitation bei humanen Spermien auf einen Zeitraum von 50 min bis hin zu

4 h beschränkt (Cohen-Dayag, Ralt et al. 1994, Cohen-Dayag, Tur-Kaspa et al. 1995).

Um eine genauere Vorstellung über den Anteil der kapazitierten Spermien innerhalb einer Spermienpopulation zu bekommen, müsste man in den vorliegenden Thermotaxis-Assays eine Kontrolle über die Kapazitationsfähigkeit der Spermien integrieren. Aufbauend auf den Erkenntnissen von Bahat et al. und den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen könnte diese Hypothese in weiterführenden Untersuchungen auch im humanen System getestet werden. Hierzu müsste man videomikroskopische Thermotaxis-Assays differenziert mit Spermienpopulationen durchführen, die vor ihrer Verwendung jeweils in einem CO₂-Brutschrank inkubiert, also kapazitiert, oder nicht inkubiert wurden.

Die Beobachtung, dass nur kapazitierte Spermien die Fähigkeit besitzen, thermotaktisch zu reagieren, lässt sich auch auf das Migrationsverhalten humaner Spermien entlang eines Chemokingradienten übertragen (Abb. 1). Anhand verschiedener Studien konnte hier gezeigt werden, dass sich die Anzahl chemosensibler Spermien auf den geringen Anteil (2 – 12 %) kapazitierter Spermien beschränkt (Cohen-Dayag, Ralt et al. 1994, Cohen-Dayag, Tur-Kaspa et al. 1995, Eisenbach 1999, Giojalas, Rovasio et al. 2004, Eisenbach and Giojalas 2006, Spehr, Schwane et al. 2006). Derselbe Mechanismus findet sich bei kapazitierten Mäusespermien (Giojalas and Rovasio 1998, Oliveira, Tomasi et al. 1999). Die Arbeitsgruppe um Fabro et al. 2002 hat die Korrelation zwischen Kapazitation und Chemotaxis überprüft, indem der Anteil kapazitierter Spermien aus der Differenz zwischen der Anzahl Akrosomen-reagibler Spermien vor und nach einer induzierten Akrosomenreaktion bestimmt wurde (Fabro, Rovasio et al. 2002). Die Fähigkeit zur Akrosomenreaktion wurde mit einem spezifischen Akrosomenmarker, gekoppelt an ein Fluoreszein, überprüft (Fabro, Rovasio et al. 2002). Anschließend wurde der Anteil kapazitierter Spermien mit dem Anteil der Spermien verglichen, die auf Chemotaxis reagieren können. Es wurde ein Verlust der Chemosensibilität nach Entfernung der kapazitierten Zellen, sowie ein Wiedereintreten nach Zugabe kapazitierter Spermien (Fabro, Rovasio et al. 2002) beobachtet.

Voraussetzung für die Wahrnehmung eines Temperaturgradienten sind spezifische Thermosensoren. Bei Eukaryoten fungieren temperaturgesteuerte Ionenkanäle, die zu der Superfamilie der TRPs gehören, als Thermosensor (Patapoutian, Peier et al. 2003). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wodurch Spermien in der Lage sind, Temperaturunterschiede wahrzunehmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auf Genexpressionsebene gezeigt werden, dass – in Reihenfolge der höchsten Expressionslevel – *TRPV1* gefolgt von *TRPV4*, *TRPV2* und *TRPV3* durch humane Spermien exprimiert werden. Diese Beobachtung deckt sich z.T. mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Francavilla *et al.*, die zeigen konnte, dass *TRPV1* durch humane Spermien exprimiert wird (Francavilla, Battista et al. 2009). Expressionsdaten zu den anderen Subtypen des TRPV-Rezeptors waren jedoch bisher unzureichend. Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals mittels immunzytochemischer Analysen gezeigt werden, dass bei humanen Spermien *TRPV1*, *TRPV3* und *TRPV4* im Bereich des Mittelstücks und Flagellums lokalisiert sind.

Der aktivierende Temperaturbereich der TRPV variiert von Subtyp zu Subtyp. Den physiologischen Temperaturbereich decken v.a. die Subtypen *TRPV3* (> 33 °C) und *TRPV4* (> 24 °C) ab (Lee and Caterina 2005, Nilius and Voets 2005). Um nun zu untersuchen, welche Rolle TRPV auf humanen Spermien für die Wahrnehmung eines Temperaturgradienten spielen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Thermotaxis-Assays in An- und Abwesenheit des nicht-selektiven TRPV-Antagonisten Rutheniumrot durchgeführt (Patapoutian, Peier et al. 2003, Chung, Lee et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Rutheniumrot durchaus die gerichtete Spermienmigration in Richtung eines Temperaturgradienten zu beeinflussen scheint. So zeigte sich in dem Thermotaxis-Assay dieser Arbeit eine signifikante Zunahme der gerichteten Spermienmigration in Richtung des Temperatur-Gradienten ($P = 0,0020$, Abb. 8A; $P = 0,0094$, Abb. 8B). Dementsprechend wurde eine Zunahme des prozentualen Anteils der Spermien beobachtet, die gerichtet unter Einfluss des Temperaturgradienten migrieren, und zwar um 9,17 % von 19,67 % auf 28,84 % (Abb. 8A) bzw. um 12,44 % von 26,34 % auf 38,78 % (Abb. 8B). Nach Applikation von Rutheniumrot (500 μM) wurde eine signifikante Abnahme der Spermienmigration um 17,57 % von 38,78 % auf 21,21 % in Richtung des Temperaturgradienten nachgewiesen ($P = 0,0006$, Abb. 8B).

Entgegen der Beobachtungen dieser Arbeit, die also zeigt, dass sich der Anteil thermoreagibler Spermien nach Inhibition von TRPV mittels Rutheniumrot tendenziell reduziert, propagierte die Arbeitsgruppe Bahat et al. 2009, dass TRPV keinen Einfluss auf Thermotaxis haben (Bahat et al. 2009). In ihrer Arbeit untersuchten die Autoren den möglichen Einfluss von TRPV auf die Migration humaner Spermien entlang des Temperaturgradienten durch die Applikation von Rutheniumrot in einer Konzentration von 10 μM - 40 μM . Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Rutheniumrot keinen Einfluss auf das thermotaktische Verhalten der humanen Spermien hatte. Allerdings wurden durch Bahat et al. Konzentrationen des Inhibitors verwendet, die 100-mal geringer waren als die Konzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse könnten auf eine konzentrationsabhängige Wirkung des TRPV-Antagonisten zurückzuführen sein. In diesem Kontext ist darauf hinzuweisen, dass in der allgemeinen Literatur niedrige Konzentrationen von ca. 1 μM - 10 μM (Chung, Lee et al. 2004, Tanaka, Muraki et al. 2008) bzw. 40 μM - 100 μM (Petho, Izydorczyk et al. 2004, Bahat and Eisenbach 2009) verwendet werden. Die Ergebnisse des Thermotaxis-Assays deuten allerdings darauf hin, dass der gerichtete Migrationseffekt bei Verwendung der höheren Inhibitorkonzentration von 500 μM stärker blockiert wird, als bei einer geringeren Dosis von 100 μM Rutheniumrot (Abb. 8). Fraglich ist in diesem Zusammenhang, inwiefern hierbei ein dosisabhängiger, toxischer Effekt zum Tragen kommt. Diesbezüglich zeigte sich in unseren videomikroskopischen Analysen jedoch kein Anhaltspunkt für eine erhöhte Anzahl immobiler, also toter Spermien bei der Verwendung von Rutheniumrot in höheren Konzentrationen von 500 μM , sodass ein toxischer Effekt unwahrscheinlich erscheint. In weiterführenden Untersuchungen könnte dieser Aspekt allerdings durch Dosis-Titrationsuntersuchungen unter Analyse der Spermiovitalität adressiert werden.

Interessanterweise propagieren Bahat et al. für eine andere Untergruppe der TRP-Rezeptoren, den TRPCs, eine relevante Funktion als Thermosensor (Bahat and Eisenbach 2009). Tatsächlich konnten Jungnickel et al. zeigen, dass TRPCs in Mäusespermien exprimiert werden. TRPC1 und TRPC3 sind im Bereich des Flagellums lokalisiert, TRPC2 und TRPC6 im Bereich des Caputs (Jungnickel, Marrero et al. 2001, Trevino, Serrano et al. 2001, Castellano,

Trevino et al. 2003). Allerdings konnte bis dato nicht nachgewiesen werden, ob Rezeptoren dieser Untergruppe bei Spermien als Thermosensoren fungieren. TRPC wird durch die Phospholipase C aktiviert, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu 1,4,5-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (Hofmann and Majerus 1982) hydrolisiert. Der IP₃-Rezeptor ist an der Regulation eines internen Kalziumspeichers beteiligt und hat die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium zur Folge (Bootman, Collins et al. 2002). Die Entleerung des Kalziumspeichers in der Zelle führt zur Aktivierung der Speicher-abhängigen Kalziumkanäle (engl. store operated Ca²⁺-Channels, SOCs), um den Speicher mit extrazellulärem Kalzium wieder aufzufüllen (Dutta 2000). In einem Migrations-Assay konnten Bahat et al. nachweisen, dass sich das Migrationsverhalten von Spermien entlang eines Temperaturgradienten unter Zugabe von U73122, eines Inhibitors der Phospholipase C, um ca. 50 % reduziert (Bahat and Eisenbach 2009). Ein ähnlicher Effekt auf das Migrationsverhalten humaner Spermien wurde nach der Applikation von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), einem Inhibitor der IP₃-Rezeptoren und SOCs (Bootman, Collins et al. 2002), beobachtet (Bahat and Eisenbach 2009). Zusammenfassend zeigt sich, dass die molekularen Strukturen, die der Thermotaxis humaner Spermien zugrunde liegen, vielfältig sind. Entgegen der Ergebnisse von Bahat et al. lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine mögliche Bedeutung von TRPV-Rezeptoren für die Thermotaxis humaner Spermien vermuten.

Diese Erkenntnis führt zu der Frage nach der klinischen Relevanz der in dieser Arbeit generierten Ergebnisse. Thermotaxis als Navigationsmechanismus zwischen Spermien und Eizelle könnte z.B. bei der Spermiselektion im Rahmen der *In-vitro*-Fertilisation (IVF) genutzt werden. Neben Selektionsmechanismen wie dem *Swim-Up*, bei dem die Spermien mit optimaler Motilität von nicht-motilen Spermien und anderen Bestandteilen des Ejakulates getrennt werden (Parrish, Krogenaes et al. 1995, Xu, Lu et al. 2000), könnten durch einen Thermotaxis-Assay thermosensible, respektive und/oder durch Chemotaxis-Assays chemosensible Spermien selektioniert werden. Dadurch könnte z.B. für die Intrazytoplasmatische *Single Sperm* Inseminations-Methode (ICSI) oder die intrauterine Insemination (IUI) eine Auswahl von Spermien getroffen werden, die motil und thermosensibel sind. Dieses

Vorgehen könnte den Fertilisationsprozess bzw. Spermiselektionsprozess unter physiologischen Bedingungen besser abbilden als aktuelle Therapiestandards und somit unter Umständen die Fertilisationsquote erhöhen, respektive potentielle Spätfolgen der ICSI reduzieren.

Seit 1978 das erste mittels IVF gezeugte Kind, Lousie Brown, geboren wurde (Step toe and Edwards 1978, Edwards, Step toe et al. 1980), zeigt sich in der Reproduktionsmedizin seither ein Trendanstieg für das ICSI-Verfahren (Ferraretti, Goossens et al. 2012, Nyboe Andersen, Carlsen et al. 2008, Nyboe Andersen, Goossens et al. 2009) vor allem in Frankreich, Deutschland, Spanien, Großbritannien und Italien (de Mouzon, Goossens et al. 2012). Erfahrungsgemäß entwickeln sich die meisten Kinder, die mittels IVF und ICSI gezeugt werden, normal und sind gesund (Squires, Carter et al. 2003). Mit dem wachsenden Trend der Anwendung von Reproduktionsverfahren werden aber nun auch immer mehr Studien publiziert, die sich mit den Risiken der einzelnen Verfahren und ihren Spätfolgen wie z.B. Malformationen, Genomfehlern, den Unterschieden der körperlichen und kognitiven Entwicklung von ART- und Nicht-ART-Kindern befassen (Thompson, Kind et al. 2002). Ergebnisse dieser Analysen sind interessanterweise äußerst heterogen.

Ein geringes Risiko für mögliche Spätfolgen der ART, wie z.B. Malformationen, wird in einer chinesischen Multicenter-Studie bei ART-Kindern auf 1,23 % und bei Nicht-ART-Kindern auf 1,35 % (Yan, Huang et al. 2010) beziffert. Auch eine Meta-Analyse von 19 Studien von Rimm et al. propagiert, dass das Malformationsrisiko bei ART-Kindern nicht signifikant erhöht ist (Rimm et al. 2004). Neben dem Risiko für Malformationen gibt es ferner Studien, die keine Korrelation zwischen ART und genomischen „*Imprinting*“-Fehlern (Bowdin, Allen et al. 2007) nachweisen konnten. Bezüglich der körperlichen Entwicklung propagieren zum Beispiel Belva et al., dass bei ICSI-gezeugten Kindern keine Unterschiede bei der Entwicklung der Menarche, der Geschlechtsorgane und der Schambehaarung bestehen (Belva, Roelants et al. 2012). Ferner sei das allgemeine Gesundheitsbefinden und die Prävalenz chronischer Erkrankungen bei ART-Kindern zwischen 18 - 26 Jahren mit der der Allgemein-Bevölkerung vergleichbar (Beydoun, Sicignano et al. 2010). Die Arbeitsgruppe um Leunes et al. 2006 beobachtete 8 - 10-jährige Kinder bezogen auf die Entwicklung der kognitiven Funktionen und der motorischen Fähigkeiten (Leunens, Celestin-

Westreich et al. 2006). Es wurden keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich beider Gruppen in Bezug auf Parameter wie Kommunikation, Selbstständigkeit, Lokomotion, Arbeitskraft, Sozialisierungsfähigkeit und Selbstmanagement beschrieben – Beobachtungen, die auch von anderen Gruppen bestätigt wurden (Carson, Kurinczuk et al. 2009, Xing, Qu et al. 2011, Squires, Carter et al. 2003, Katalinic, Rosch et al. 2004, Ponjaert-Kristoffersen, Bonduelle et al. 2005, Leunens, Celestin-Westreich et al. 2006, Leunens, Celestin-Westreich et al. 2008, Wagenaar, Ceelen et al. 2008, Wagenaar, van Weissenbruch et al. 2009). Knoester et al. berichteten, dass Verhaltensweisen zwischen ART-Kindern und natürlich geborenen Kindern vergleichbar sind (Knoester, Helmerhorst et al. 2007). Auch bezogen auf das Vorkommen von z.B. autistischem Verhalten konnte in einer dänischen Studie kein signifikanter Unterschied zwischen ART- und Nicht-ART-Kindern, die zwischen 1995 und 2003 geboren wurden, festgestellt werden (Hvidtjorn, Grove et al. 2010).

Entgegen dieser Vielzahl von Studien, die bezüglich der Folgen der ART ein unkritisches Bild zeichnen, finden sich allerdings auch zahlreiche Studien, die beim Vergleich der Entwicklung von ART- und Nicht-ART-Kindern sehr wohl Unterschiede identifizieren konnten. Es werden sowohl Unterschiede in der frühen Entwicklungsphase der Kinder beschrieben, wie z.B. perinatale Komplikationen, Malformationen und Genomfehler, als auch Spätfolgen, die die spätere körperliche und geistige Entwicklung der Kinder betreffen. So werden bei Kindern, die mittels ART gezeugt werden, eine erhöhte Frühgeburtenrate, ein erhöhtes Risiko für ein vermindertes Gestationsalter, ein geringes Geburtsgewicht, sowie eine erhöhte perinatale Mortalität und eine damit verbundene längere Krankenhausverweildauer beobachtet (Henningesen, Pinborg et al. 2010, Schieve, Meikle et al. 2002, Bower and Hansen 2005, Kallen, Finnstrom et al. 2005, De Geyter, De Geyter et al. 2006). Außerdem wird eine erhöhte Mehrgeburtenrate (25 – 51 %) (de Mouzon, Goossens et al. 2012, Olivennes 2005, Menacker and Martin 2009, Sunderam, Chang et al. 2009) sowie ein erhöhtes Risiko für Geburtsfehler bzw. kongenitale Missbildungen beschrieben (Davies, Moore et al. 2012, Wen, Jiang et al. 2012, Schieve, Meikle et al. 2002, Bonduelle, Bergh et al. 2004, Rimm, Katayama et al. 2004, Bower and Hansen 2005). Im Vergleich zu spontan gezeugten Kindern zeigen verschiedene Metaanalysen einen Anstieg von ca. 30 – 40 % für

Malformationen (Rimm, Katayama et al. 2004, Hansen, Bower et al. 2005) bzw. eine signifikante Risikoerhöhung für Geburtsdefekte bei ART-Kindern (8,3 %) im Vergleich zu Nicht-ART-Kindern (5,8 %) (Davies, Moore et al. 2012). In einer iranischen Studie wird zudem zwischen den einzelnen ART-Verfahren differenziert. Demnach besteht für Malformationen bei ICSI-Kindern eine Prävalenz von 6,5 % und bei IVF-Kindern eine Prävalenz von 15,9 % (Farhangniya, Dortaj Rabori et al. 2014). Verschiedene Studien berichten über ein erhöhtes Risiko für Herzfehler, wie z.B. die Fallotsche Tetralogie, ein erhöhtes Risiko für Extremitätenmissbildungen oder Malformationen des Urogenitalsystems, wie z.B. nicht-deszendierende Hoden (Klemetti, Gissler et al. 2005, Olson, Keppler-Noreuil et al. 2005). Die Risiko-Ratio (RR) für das jeweilige Organsystem beziffern sich z.B. auf eine RR von 2,01 für das Nervensystem, eine RR von 1,69 für das Urogenitalsystem, eine RR von 1,66 für das Magendarm-System, eine RR von 1,64 für das Kreislaufsystem, eine RR von 1,48 für das Muskuloskelettsystem und eine RR von 1,43 für Auge, Ohren, Gesicht und Hals (Wen, Jiang et al. 2012).

Seit 2002 wird außerdem beschrieben, dass ART-Kinder ein bis zu vierfach erhöhtes Risiko für „*Imprinting*“-Fehler aufweisen, wie z.B. das Beckwith-Wiedemann-Syndrom, das Angelmann-Syndrom oder bestimmte Tumorerkrankungen, wie etwa das Retinoblastom (DeBaun, Niemitz et al. 2003, Maher, Brueton et al. 2003, Chang, Moley et al. 2005, Sutcliffe, Peters et al. 2006, Laprise 2009). Bezogen auf die späten Folgen der Entwicklung von ART-Kindern wird bei einem Vergleich von 5 - 6-Jährigen darüber hinaus ein signifikant erhöhtes Längenwachstum (Miles, Hofman et al. 2007, Makhoul, Tamir et al. 2009) sowie ein Unterschied bei der Brustentwicklung beobachtet (Belva, Roelants et al. 2012). Hormonelle Veränderungen scheinen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen. Ein fortgeschrittenes Knochenalter, eine Erhöhung der Hormone Dehydroepiandrosteron (DHEAS) und des luteotropen Hormons (LH) bei IVF-Mädchen (Ceelen, van Weissenbruch et al. 2008, Ceelen, van Weissenbruch et al. 2008) sowie ein erniedrigter Testosteronspiegel und eine veränderte LH/Testosteron-Ratio bei ICSI-Jungen zum Zeitpunkt der Geburt bis zum Alter von 3 Monaten werden berichtet (Mau Kai, Main et al. 2007). Außer hormonell bedingten Unterschieden, die zu einer veränderten körperlichen Entwicklung führen,

wurde auch ein verändertes kardiovaskuläres Risikoprofil bei ART-Kindern beobachtet. Es wird ein erhöhtes Risiko für kardiovaskulär bedingte Erkrankungen beschrieben (Belva, Roelants et al. 2012, Scherrer, Rimoldi et al. 2012, Scott, Yamazaki et al. 2010, Ceelen, van Weissenbruch et al. 2008, Wikstrand, Niklasson et al. 2008). Die Arbeitsgruppe um Ceelen et al. konnte 2008 zeigen, dass ART-Kinder zwischen 8 und 18 Jahren einen erhöhten Blutdruck und erhöhte Nüchternblutzuckerwerte aufweisen (Ceelen, van Weissenbruch et al. 2008). Es wird berichtet, dass ART-Kinder, die initial als gesund eingestuft wurden, ein erhöhtes Risiko für eine generalisierte Gefäßdysfunktion haben. Diese geht mit einer um 25 % geringeren mittleren Fluss-gesteuerten Dilatation der *A. brachialis*, einer schnelleren Flussgeschwindigkeit zwischen Karotis- und-Femoralarterie, einer dickeren Intima der *A. carotis* und einem um 30 % erhöhten pulmonalarteriellen Druck einher (Scherrer, Rimoldi et al. 2012). Zudem konnten Wikstrand et al. 2008 eine abnormale Vaskularisation der Retina bei ICSI-Jungen nachweisen. Bezogen auf das metabolische Syndrom wurde ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung von zentraler, peripherer und totaler Adipositas bei ICSI-Mädchen festgestellt (Belva, Painter et al. 2011). Andere Studien beschreiben, dass ART-Kinder auch anfälliger für Kinderkrankheiten sind (Koivurova, Hartikainen et al. 2003, Bonduelle, Wennerholm et al. 2005, Kallen, Finnstrom et al. 2005, Ludwig, Katalinic et al. 2009). Eine Multicenter-Kohortenstudie mit 540 ICSI-, 437 IVF- und 538 Nicht-ART-Kindern zeigte für ART-Kinder ein signifikant erhöhtes Risiko für Erkrankungen im Kindesalter sowie eine erhöhte Notwendigkeit für Operationen, eine gesteigerte Inanspruchnahme medizinischer Hilfe und schließlich eine größere Zahl von Krankenhausaufenthalten (Bonduelle, Wennerholm et al. 2005).

Bei Betrachtung der kognitiven Entwicklung zwischen ART- und Nicht-ART-Kindern wurden neurologische Entwicklungsfehler wie z.B. das Vorkommen der Zerebralparalyse häufiger bei ART-Kindern beobachtet als bei Nicht-ART-Kindern (Kallen, Finnstrom et al. 2010, Zhu, Hvidtjorn et al. 2010, Stromberg, Dahlquist et al. 2002, Klemetti, Sevon et al. 2006, Romundstad, Romundstad et al. 2008, Hvidtjorn, Schieve et al. 2009). Auch die Prävalenz für autistische Erkrankungen ist bei ICSI-Kindern erhöht (Knoester, Vandenbroucke et al. 2007). Die Rate von Autisten in einer israelischen Studie betrug bei der ART-

Guppe 10,7 % im Vergleich zu 3,06 % bei der Normalbevölkerung (Zachor and Ben Itzchak 2011).

Die heterogene Datenlage zu den potentiellen Folgen der ART für die entsprechenden Kinder unterstreicht den Bedarf nach großen Langzeit-Follow-up Studien und Meta-Analysen. Da die Mehrzahl publizierter Studien sehr wohl Folgeschäden für die genetische, körperliche und geistige Entwicklung von ART-Kindern beschreibt, ist ein erhöhtes Risiko für das Auftreten z.B. von Malformationen, Genomfehlern oder Autismus durchaus wahrscheinlich. Folglich erscheint es sinnvoll, bereits vor Anwendung der assistierten Reproduktionsverfahren optimale Bedingungen für die Spermiselektion zu schaffen. Eine verbesserte Selektion, z.B. durch Verfahren wie den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen videomikroskopischen Thermotaxis-Assays, könnte unter Umständen die Rate an Folgeschäden senken. Diese Hypothese bleibt allerdings zu diesem Zeitpunkt Gegenstand möglicher zukünftiger Studien.

Die potenzielle klinische Bedeutung der Thermotaxis menschlicher Spermien ist aber nicht auf die Verfahren der ART beschränkt. Im Gegenzug ist auch eine Nutzung der Erkenntnisse für Verfahren der Kontrazeption prinzipiell denkbar. So könnte z.B. eine gestörte Thermosensibilität im Kontext der männlichen Infertilität eine wichtige Rolle spielen. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass weltweit ca. 10 % der Paare nach einem Jahr von dem Problem eines unerfüllten Kinderwunsches betroffen sind (Tresidder 1975, Boivin, Bunting et al. 2007). Eine WHO-Studie kommt zu dem Ergebnis, dass in einem Zeitraum von 1982-1985 in ca. 38 % der untersuchten Fälle die Ursachen eines unerfüllten Kinderwunsches bei der Frau lagen, während in ca. 15 % der Fälle die Ursachen unbekannt blieben und schließlich in 20 % der Fälle die Ursache der Infertilität beim Mann identifiziert werden konnte. Bei den restlichen 27 % wurden Ursachen bei beiden Partnern gefunden (Hamada, Esteves et al. de Kretser 1997). Neuere epidemiologische Studien berichten kontrovers über die Prävalenz der Infertilität (Gurunath, Pandian et al. 2011). Zahlreiche Ursachen wie z.B. Azoospermie, Kryptorchismus oder rezidivierende Epididymitis wurden im Zusammenhang mit männlicher Infertilität identifiziert. Bisherige Arbeiten zum Thema Fertilitätskontrolle haben gezeigt, dass unterschiedliche Ionenkanäle wie z.B. der *Cationic channel of sperm* (engl. *CatSper*) auf

humanen Spermien Einfluss auf die Fertilität haben (Ren, Navarro et al. 2001). Der Ionenkanal *CatSper* besteht aus vier Spermien-spezifischen Transmembranproteinen und ist für Kalzium permeabel (Ren, Navarro et al. 2001). Er ist auf dem Spermienflagellum lokalisiert (Lishko, Kirichok et al. 2012, Lishko 2012) und führt dort durch einen intrazellulären Kalziumanstieg zu einer gesteigerten Schlagfrequenz (Qi, Moran et al. 2007). Diese Hyperaktivität erhöht die Spermienmotilität und ist ein attraktives Ziel für nicht-hormonelle männliche Kontrazeption (Page, Amory et al. 2008). Bisherige Studien konnten jedoch noch keinen Antagonisten dieses Ionenkanals identifizieren. Analog zu dem beschriebenen Kalziumkanal könnten auch TRPVs als Zielstruktur nicht-hormoneller Kontrazeption dienen.

Kontrazeptive Methoden beim Mann werden in zwei Kategorien eingeteilt: Die erste Gruppe umfasst jene, die Einfluss auf die Spermatogenese nehmen und einen hormonellen Angriffspunkt verfolgen (Nieschlag, Wang and Swerdloff, Page, Amory et al. 2008). Die zweite Kategorie moduliert die Interaktion zwischen Spermien und Eizelle und basiert auf hormon-unabhängigen Mechanismen (Ren, Navarro et al. 2001, Page, Amory et al. 2008). Dabei werden entweder die Spermienmotilität oder Fertilisationsabläufe verändert. Hormonelle Kontrazeption z.B. durch die Gabe von Testosteron (World Health Organization 1990, World Health Organization 1996, Turner, Conway et al. 2003) hat den Nachteil, dass sie mit verschiedenen Nebenwirkungen (Ilani, Swerdloff et al. 2011) wie z.B. einer Gewichtszunahme (Katznelson, Finkelstein et al. 1996, Wang, Cunningham et al. 2004, Hay, Brady et al. 2005), Akne (Bebb, Anawalt et al. 1996, Wu, Farley et al. 1996, Hay, Brady et al. 2005, Mahabadi, Amory et al. 2009), Nachtschweiß (Hay, Brady et al. 2005, Mommers, Kersemaekers et al. 2008), Gynäkomastie (Wu, Farley et al. 1996), der Abnahme des Hodenvolumens (McLachlan, O'Donnell et al. 2002, Wang, Cui et al. 2007), Hyperviskosität des Spermas (Fernandez-Balsells, Murad et al. 2010, Bhasin, Storer et al. 1996, Coviello, Kaplan et al. 2008), Stimmungslabilität (Meriggiola, Bremner et al. 1997, Gonzalo, Swerdloff et al. 2002, Turner, Conway et al. 2003, Gui, He et al. 2004, Hay, Brady et al. 2005) und Veränderungen der Lipidzusammensetzung (World Health Organization 1996, Bebb, Anawalt et al. 1996, Gonzalo, Swerdloff et al. 2002, Gui, He et al. 2004, Hay, Brady et al. 2005) assoziiert sind (Page, Amory et al. 2008). Diese

nachteiligen Effekte kompensieren im Normalfall nicht die Testosterontherapie-assoziierten „Vorteile“, wie z.B. den Anstieg von Muskelmasse (Bhasin, Storer et al. 1996), die Reduktion des Fettanteils oder die Zunahme der Knochendichte (Behre, Kliesch et al. 1997, Wang, Cunningham et al. 2004). Darüber hinaus muss angemerkt werden, dass der Eingriff in den männlichen Hormonhaushalt für gewöhnlich nicht mit dem Ziel der Kontrazeption erfolgt, sondern dies als unter Umständen unerwünschte Nebenwirkung auftritt. Eindrucksvoll zeigen sich Testosteron-induzierte Effekte oder Komplikationen vor allem bei nicht-ärztlich kontrolliertem, illegalem Einsatz im Sport (Schlagwort: „*Doping & Body-Building*“).

Dementgegen verfolgen nicht-hormonelle Kontrazeptionsmethoden das Ziel, Spermienproduktion und Spermienmotilität zu beeinflussen (Page, Amory et al. 2008). Ionenkanäle, die bei der Interaktion zwischen Spermien und Eizelle involviert sind, könnten prospektiv als therapeutischer Angriffspunkt zur nicht-hormonellen Kontrazeption genutzt werden (Eisenbach and Giojalas 2006).

Darüber hinaus spielen Ionenkanäle auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Spermienreifungsprozesses im weiblichen Genitaltrakt und triggern sowohl die Spermienmotilität als auch die Chemotaxis und Akrosomenreaktion (Lishko, Botchkina et al. 2011, Lishko, Kirichok et al. 2012). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob dysfunktionale TRPV-Rezeptoren auf humanen Spermien zur Infertilität beitragen. Bisherige Studien haben gezeigt, dass der Fertilisationsphänotyp von z.B. *CatSper*^{-/-} Mäusen identisch mit einem Phänotyp für Infertilität ist (Chung, Navarro et al. 2011) und Männer mit einer Mutation oder Deletion in *CatSper* infertil sind (Hildebrand, Avenarius et al. 2010, Zhang, Malekpour et al. 2007, Avenarius, Hildebrand et al. 2009). Für TRPV-Knockout-Mäuse (TRPV^{-/-}) ist unseres Wissens nach bis dato kein entsprechender Fertilisationsphänotyp beschreiben worden. Dies könnte aber auch daher rühren, dass bis dato keine genaueren Analysen in diesem Kontext erfolgt sind (z.B. systematische Analysen der Wurf-Größen, o.ä.). Entsprechende Untersuchungen könnten Inhalt zukünftiger Studien mit entsprechenden Mausmodellen sein.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals mittels Videomikroskopie die Thermotaxis humaner Spermien *in vitro* dargestellt

werden. Die funktionellen Analysen des Migrationsverhaltens humaner Spermien entlang eines Temperaturgradienten in An- und Abwesenheit des unselektiven TRPV-Inhibitors Rutheniumrot zeigten einen konzentrationsabhängigen Trend zu einer schwächeren migratorischen Antwort, auch wenn keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Darüber hinaus konnten wir ein definiertes TRPV-Expressionsprofil humaner Spermien sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Proteinebene generieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass TRPV eine Rolle für die Navigation von humanen Spermien zur Eizelle und folglich für den gesamten Prozess der Befruchtung spielen könnten. Im Bereich der Reproduktionsmedizin eröffnen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit neue Perspektiven für den Einsatz der Thermotaxis als möglichen Spermiselektionsmechanismus im Rahmen von ART-Verfahren oder für die Entwicklung nicht-hormoneller Kontrazeptiva.

6 Literatur

- (1990). "Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia in normal men. World Health Organization Task Force on methods for the regulation of male fertility." Lancet **336**(8721): 955-9.
- (1996). "Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men." Fertil Steril **65**(4): 821-9.
- Abed, E., D. Labelle, et al. (2009). "Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells." Mol Membr Biol **26**(3): 146-58.
- Alexander, S. P., A. Mathie, et al. (2004). "Guide to receptors and channels, 1st edition." Br J Pharmacol **141 Suppl 1**: S1-126.
- Amann, R. and C. A. Maggi (1991). "Ruthenium Red as a Capsaicin Antagonist." Life Sciences **49**(12): 849-856.
- Anderson, R. A., Jr., K. A. Feathergill, et al. (1995). "Atrial natriuretic peptide: a chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway." Mol Reprod Dev **40**(3): 371-8.
- Avenarius, M. R., M. S. Hildebrand, et al. (2009). "Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein." Am J Hum Genet **84**(4): 505-10.
- Bahat, A. and M. Eisenbach (2006). "Sperm thermotaxis." Mol Cell Endocrinol **252**(1-2): 115-9.
- Bahat, A. and M. Eisenbach (2009). "Human sperm thermotaxis is mediated by phospholipase C and inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ channel." Biol Reprod **82**(3): 606-16.
- Bahat, A., M. Eisenbach, et al. (2005). "Perioovulatory increase in temperature difference within the rabbit oviduct." Hum Reprod **20**(8): 2118-21.
- Bahat, A., I. Tur-Kaspa, et al. (2003). "Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract." Nat Med **9**(2): 149-50.
- Baillie, H. S., A. A. Pacey, et al. (1997). "Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla." Hum Reprod **12**(9): 1985-92.

- Barros, C., P. Vigil, et al. (1984). "Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus." Arch Androl **12 Suppl**: 95-107.
- Bebb, R. A., B. D. Anawalt, et al. (1996). "Combined administration of levonorgestrel and testosterone induces more rapid and effective suppression of spermatogenesis than testosterone alone: a promising male contraceptive approach." J Clin Endocrinol Metab **81**(2): 757-62.
- Beech, D. J., K. Muraki, et al. (2004). "Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP." J Physiol **559**(Pt 3): 685-706.
- Behre, H. M., S. Kliesch, et al. (1997). "Long-term effect of testosterone therapy on bone mineral density in hypogonadal men." J Clin Endocrinol Metab **82**(8): 2386-90.
- Belva, F., R. Painter, et al. "Are ICSI adolescents at risk for increased adiposity?" Hum Reprod **27**(1): 257-64.
- Belva, F., M. Roelants, et al. "Blood pressure in ICSI-conceived adolescents." Hum Reprod **27**(10): 3100-8.
- Belva, F., M. Roelants, et al. "Pubertal development in ICSI children." Hum Reprod **27**(4): 1156-61.
- Beydoun, H. A., N. Sicignano, et al. "A cross-sectional evaluation of the first cohort of young adults conceived by in vitro fertilization in the United States." Fertil Steril **94**(6): 2043-9.
- Bhasin, S., T. W. Storer, et al. (1996). "The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men." N Engl J Med **335**(1): 1-7.
- Bielawa, H., O. Hinrichsen, et al. (2001). "Der Ammoniakkatalysator der nächsten Generation: Barium-promotiertes Ruthenium auf oxidischen Trägern." Angewandte Chemie **113**(6): 1093-1096.
- Birder, L. A., A. J. Kanai, et al. (2001). "Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13396-401.
- Boivin, J., L. Bunting, et al. (2007). "International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care." Hum Reprod **22**(6): 1506-12.

- Bonduelle, M., C. Bergh, et al. (2004). "Medical follow-up study of 5-year-old ICSI children." Reprod Biomed Online **9**(1): 91-101.
- Bonduelle, M., U. B. Wennerholm, et al. (2005). "A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception." Hum Reprod **20**(2): 413-9.
- Bonner, J. T., W. W. Clarke, Jr., et al. (1950). "The orientation to light and the extremely sensitive orientation to temperature gradients in the slime mold *Dictyostelium discoideum*." J Cell Physiol **36**(2): 149-58.
- Bootman, M. D., T. J. Collins, et al. (2002). "2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release." FASEB J **16**(10): 1145-50.
- Bowdin, S., C. Allen, et al. (2007). "A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders." Hum Reprod **22**(12): 3237-40.
- Bower, C. and M. Hansen (2005). "Assisted reproductive technologies and birth outcomes: overview of recent systematic reviews." Reprod Fertil Dev **17**(3): 329-33.
- Carson, C., J. J. Kurinczuk, et al. "Cognitive development following ART: effect of choice of comparison group, confounding and mediating factors." Hum Reprod **25**(1): 244-52.
- Castellano, L. E., C. L. Trevino, et al. (2003). "Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility." FEBS Lett **541**(1-3): 69-74.
- Caterina, M. J. and D. Julius (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." Annu Rev Neurosci **24**: 487-517.
- Caterina, M. J., A. Leffler, et al. (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." Science **288**(5464): 306-313.
- Caterina, M. J., T. A. Rosen, et al. (1999). "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat." Nature **398**(6726): 436-41.

- Ceelen, M., M. M. van Weissenbruch, et al. (2008). "Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: follow-up study." J Clin Endocrinol Metab **93**(5): 1682-8.
- Ceelen, M., M. M. van Weissenbruch, et al. (2008). "Growth and development of children born after in vitro fertilization." Fertil Steril **90**(5): 1662-73.
- Ceelen, M., M. M. van Weissenbruch, et al. (2008). "Pubertal development in children and adolescents born after IVF and spontaneous conception." Hum Reprod **23**(12): 2791-8.
- Chang, A. S., K. H. Moley, et al. (2005). "Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients." Fertil Steril **83**(2): 349-54.
- Cho, C., D. O. Bunch, et al. (1998). "Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta." Science **281**(5384): 1857-9.
- Chung, J. J., B. Navarro, et al. "A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa." Nat Commun **2**: 153.
- Chung, M. K., A. D. Guler, et al. (2005). "Biphasic currents evoked by chemical or thermal activation of the heat-gated ion channel, TRPV3." J Biol Chem **280**(16): 15928-41.
- Chung, M. K., H. Lee, et al. (2004). "2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3." J Neurosci **24**(22): 5177-82.
- Chung, M. K., H. Lee, et al. (2004). "TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes." J Biol Chem **279**(20): 21569-75.
- Cicinelli, E., N. Einer-Jensen, et al. (2004). "Blood to the cornual area of the uterus is mainly supplied from the ovarian artery in the follicular phase and from the uterine artery in the luteal phase." Hum Reprod **19**(4): 1003-8.
- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-24.
- Cohen-Dayag, A., D. Ralt, et al. (1994). "Sequential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa." Biol Reprod **50**(4): 786-90.

- Cohen-Dayag, A., I. Tur-Kaspa, et al. (1995). "Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11039-43.
- Coviello, A. D., B. Kaplan, et al. (2008). "Effects of graded doses of testosterone on erythropoiesis in healthy young and older men." J Clin Endocrinol Metab **93**(3): 914-9.
- David, A., A. Vilensky, et al. (1971). "[Temperature changes in different parts of the rabbit oviduct. Preliminary report]." Harefuah **80**(4): 180-2.
- Davies, M. J., V. M. Moore, et al. "Reproductive technologies and the risk of birth defects." N Engl J Med **366**(19): 1803-13.
- De Geyter, C., M. De Geyter, et al. (2006). "Comparative birth weights of singletons born after assisted reproduction and natural conception in previously infertile women." Hum Reprod **21**(3): 705-12.
- De Jonge, C. (2005). "Biological basis for human capacitation." Hum Reprod Update **11**(3): 205-14.
- de Kretser, D. M. (1997). "Male infertility." Lancet **349**(9054): 787-90.
- de Mouzon, J., V. Goossens, et al. "Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE." Hum Reprod **27**(4): 954-66.
- de Mouzon, J., V. Goossens, et al. "Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE." Hum Reprod **25**(8): 1851-62.
- DeBaun, M. R., E. L. Niemitz, et al. (2003). "Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19." Am J Hum Genet **72**(1): 156-60.
- den Dekker, E., J. G. J. Hoenderop, et al. "The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation." Cell Calcium **33**(5-6): 497-507.
- Dhaka, A., V. Viswanath, et al. (2006). "Trp ion channels and temperature sensation." Annu Rev Neurosci **29**: 135-61.
- Dierichs, R. (1979). "Ruthenium Red as a Stain for Electron-Microscopy - Some New Aspects of Its Application and Mode of Action." Histochemistry **64**(2): 171-187.

- Dutta, D. (2000). "Mechanism of store-operated calcium entry." J Biosci **25**(4): 397-404.
- Edwards, R. G., P. C. Steptoe, et al. (1980). "Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro." Br J Obstet Gynaecol **87**(9): 737-56.
- Eisenbach, M. (1999). "Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation." Dev Genet **25**(2): 87-94.
- Eisenbach, M. (1999). "Sperm chemotaxis." Rev Reprod **4**(1): 56-66.
- Eisenbach, M. and L. C. Giojalas (2006). "Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(4): 276-85.
- Eisenbach, M. and I. Tur-Kaspa (1999). "Do human eggs attract spermatozoa?" Bioessays **21**(3): 203-10.
- Fabro, G., R. A. Rovasio, et al. (2002). "Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay." Biol Reprod **67**(5): 1565-71.
- Farhangniya, M., E. Dortaj Rabori, et al. (2013) "Comparison of Congenital Abnormalities of Infants Conceived by Assisted Reproductive Techniques versus Infants with Natural Conception in Tehran." Int J Fertil Steril **7**(3): 217-24.
- Fassel, T. A. and C. E. Edmiston, Jr. (1999). "Ruthenium red and the bacterial glycocalyx." Biotech Histochem **74**(4): 194-212.
- Fernandez-Balsells, M. M., M. H. Murad, et al. (2010) "Clinical review 1: Adverse effects of testosterone therapy in adult men: a systematic review and meta-analysis." J Clin Endocrinol Metab **95**(6): 2560-75.
- Ferraretti, A. P., V. Goossens, et al. "Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE." Hum Reprod **27**(9): 2571-84.
- Francavilla, F., N. Battista, et al. (2009). "Characterization of the endocannabinoid system in human spermatozoa and involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptor in their fertilizing ability." Endocrinology **150**(10): 4692-700.
- Fukuda, M. and K. Fukuda (1994). "Uterine endometrial cavity movement and cervical mucus." Hum Reprod **9**(6): 1013-6.

- Gakamsky, A., E. Schechtman, et al. (2008). "Analysis of chemotaxis when the fraction of responsive cells is small--application to mammalian sperm guidance." Int J Dev Biol **52**(5-6): 481-7.
- Gandolfi, F. (1995). "Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells." Microsc Res Tech **32**(1): 1-12.
- Gilbert, S. F. (2000). Dev Biol.
- Giojalas, L. C. and R. A. Rovasio (1998). "Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment." Int J Androl **21**(4): 201-6.
- Giojalas, L. C., R. A. Rovasio, et al. (2004). "Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract." Fertil Steril **82**(1): 247-9.
- Gnessi, L., M. R. Ruff, et al. (1985). "Demonstration of receptor-mediated chemotaxis by human spermatozoa. A novel quantitative bioassay." Exp Cell Res **161**(1): 219-30.
- Gonzalo, I. T., R. S. Swerdloff, et al. (2002). "Levonorgestrel implants (Norplant II) for male contraception clinical trials: combination with transdermal and injectable testosterone." J Clin Endocrinol Metab **87**(8): 3562-72.
- Guatteo, E., K. K. Chung, et al. (2005). "Temperature sensitivity of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta: involvement of transient receptor potential channels." J Neurophysiol **94**(5): 3069-80.
- Gui, Y. L., C. H. He, et al. (2004). "Male hormonal contraception: suppression of spermatogenesis by injectable testosterone undecanoate alone or with levonorgestrel implants in chinese men." J Androl **25**(5): 720-7.
- Gunthorpe, M. J., C. D. Benham, et al. (2002). "The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels." Trends Pharmacol Sci **23**(4): 183-91.
- Gurunath, S., Z. Pandian, et al. (2011). "Defining infertility--a systematic review of prevalence studies." Hum Reprod Update **17**(5): 575-88.
- Hafez, E. S. (1969). "Superovulation and preservation of mammalian egg." Acta Endocrinol Suppl (Copenh) **140**: 5-44.
- Hagaman, J. R., J. S. Moyer, et al. (1998). "Angiotensin-converting enzyme and male fertility." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2552-7.

- Hamada, A., S. C. Esteves, et al. "Unexplained male infertility: diagnosis and management." Int Braz J Urol **38**(5): 576-94.
- Hansen, M., C. Bower, et al. (2005). "Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review." Hum Reprod **20**(2): 328-38.
- Hanson, F. W. and J. W. Overstreet (1981). "The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo." Am J Obstet Gynecol **140**(2): 173-8.
- Harper, M. J. K. (1982). Sperm and egg transport. Cambridge, Cambridge University Press.
- Harper, M. J. K. (1994). Gamete and zygote transport. New York, *Raven Press Ltd*.
- Harris, D. C. C., L.J. (1973). "The nomenclature of the natural alloys of osmium, iridium and ruthenium based on new compositional data of alloys from world-wide occurrences." Canadian Mineralogist **12**(2): 104-112.
- Hay, C. J., B. M. Brady, et al. (2005). "A multicenter phase IIb study of a novel combination of intramuscular androgen (testosterone decanoate) and oral progestogen (etonogestrel) for male hormonal contraception." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2042-9.
- Hedgecock, E. M. and R. L. Russell (1975). "Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(10): 4061-5.
- Heiner, I., J. Eisfeld, et al. (2003). "Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes." Cell Calcium **33**(5-6): 533-40.
- Henningsen, A. K., A. Pinborg, et al. "Perinatal outcome of singleton siblings born after assisted reproductive technology and spontaneous conception: Danish national sibling-cohort study." Fertil Steril **95**(3): 959-63.
- Higazi, A. A., D. Kniss, et al. (1996). "Thermotaxis of human trophoblastic cells." Placenta **17**(8): 683-7.
- Hildebrand, M. S., M. R. Avenarius, et al. "Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels." Eur J Hum Genet **18**(11): 1178-84.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez (2001). "Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation." Reproduction **122**(4): 519-26.

- Hofmann, S. L. and P. W. Majerus (1982). "Modulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity by phospholipid interactions, diglycerides, and calcium ions." J Biol Chem **257**(23): 14359-64.
- Hu, H. Z., Q. Gu, et al. (2004). "2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3." J Biol Chem **279**(34): 35741-8.
- Hunter, R. H. and R. Nichol (1986). "A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage." J Reprod Fertil **77**(2): 599-606.
- Hvidtjorn, D., J. Grove, et al. "Risk of autism spectrum disorders in children born after assisted conception: a population-based follow-up study." J Epidemiol Community Health **65**(6): 497-502.
- Hvidtjorn, D., L. Schieve, et al. (2009). "Cerebral palsy, autism spectrum disorders, and developmental delay in children born after assisted conception: a systematic review and meta-analysis." Arch Pediatr Adolesc Med **163**(1): 72-83.
- Ilani, N., R. S. Swerdloff, et al. "Male hormonal contraception: potential risks and benefits." Rev Endocr Metab Disord **12**(2): 107-17.
- Imada, C. and Y. Oosawa (1999). "Thermoreception of Paramecium: different Ca²⁺ channels were activated by heating and cooling." J Membr Biol **168**(3): 283-7.
- Inoue, K., S. Koizumi, et al. (2002). "Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes." Biochem Biophys Res Commun **291**(1): 124-9.
- Iqbal, M., S. Shivaji, et al. (1980). "Synthetic peptides as chemoattractants for bull spermatozoa structure activity correlations." Biochem Biophys Res Commun **96**(1): 235-42.
- Iwata, Y., Y. Katanosaka, et al. (2003). "A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel." J Cell Biol **161**(5): 957-67.
- Jaiswal, B. S., I. Tur-Kaspa, et al. (1999). "Human sperm chemotaxis: is progesterone a chemoattractant?" Biol Reprod **60**(6): 1314-9.
- Jameel, T. (2008). "Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination." J Pak Med Assoc **58**(2): 71-4.

- Jansen, R. P. (1980). "Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance." *Am J Obstet Gynecol* **136**(3): 292-308.
- Jansen, R. P. and V. K. Bajpai (1982). "Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry." *Biol Reprod* **26**(1): 155-68.
- Jungnickel, M. K., H. Marrero, et al. (2001). "Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3." *Nat Cell Biol* **3**(5): 499-502.
- Kahn-Kirby, A. H. and C. I. Bargmann (2006). "TRP channels in *C. elegans*." *Annu Rev Physiol* **68**: 719-36.
- Kallen, A. J., O. O. Finnstrom, et al. "Cerebral palsy in children born after in vitro fertilization. Is the risk decreasing?" *Eur J Paediatr Neurol* **14**(6): 526-30.
- Kallen, B., O. Finnstrom, et al. (2005). "In vitro fertilization (IVF) in Sweden: infant outcome after different IVF fertilization methods." *Fertil Steril* **84**(3): 611-7.
- Kallen, B., O. Finnstrom, et al. (2005). "In vitro fertilization in Sweden: child morbidity including cancer risk." *Fertil Steril* **84**(3): 605-10.
- Kanzaki, M., Y. Q. Zhang, et al. (1999). "Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I." *Nat Cell Biol* **1**(3): 165-70.
- Katalinic, A., C. Rosch, et al. (2004). "Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection: a controlled, prospective cohort study." *Fertil Steril* **81**(6): 1604-16.
- Katz, D. F., P. Morales, et al. (1990). "Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus." *Fertil Steril* **54**(3): 513-6.
- Katz, D. F., D. A. Slade, et al. (1997). "Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability." *Adv Contracept* **13**(2-3): 143-51.
- Katznelson, L., J. S. Finkelstein, et al. (1996). "Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism." *J Clin Endocrinol Metab* **81**(12): 4358-65.
- Kessler, F., C. Habelt, et al. (1999). "Heat-induced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA." *Pain* **83**(2): 289-95.

- Kessler, J. O., L. F. Jarvik, et al. (1979). "Thermotaxis, Chemotaxis and Age." Age **2**(1): 5-11.
- Kirschstein, T., W. Greffrath, et al. (1999). "Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists." J Neurophysiol **82**(6): 2853-60.
- Klemetti, R., M. Gissler, et al. (2005). "Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies." Fertil Steril **84**(5): 1300-7.
- Klemetti, R., T. Sevon, et al. (2006). "Health of children born as a result of in vitro fertilization." Pediatrics **118**(5): 1819-27.
- Knoester, M., F. M. Helmerhorst, et al. (2007). "Matched follow-up study of 5 8-year-old ICSI singletons: child behaviour, parenting stress and child (health-related) quality of life." Hum Reprod **22**(12): 3098-107.
- Knoester, M., J. P. Vandembroucke, et al. (2007). "Matched follow-up study of 5-8 year old ICSI-singletons: comparison of their neuromotor development to IVF and naturally conceived singletons." Hum Reprod **22**(6): 1638-46.
- Kochukov, M. Y., T. A. McNearney, et al. (2006). "Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes." Am J Physiol Cell Physiol **291**(3): C424-32.
- Koivurova, S., A. L. Hartikainen, et al. (2003). "Growth, psychomotor development and morbidity up to 3 years of age in children born after IVF." Hum Reprod **18**(11): 2328-36.
- Kunz, G., D. Beil, et al. (1996). "The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy." Hum Reprod **11**(3): 627-32.
- Kunz, G., D. Beil, et al. (2007). "Oxytocin--a stimulator of directed sperm transport in humans." Reprod Biomed Online **14**(1): 32-9.
- Kunz, G., M. Herbertz, et al. (1998). "Sonographic evidence for the involvement of the utero-ovarian counter-current system in the ovarian control of directed uterine sperm transport." Hum Reprod Update **4**(5): 667-72.
- Laprise, S. L. (2009). "Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies." Mol Reprod Dev **76**(11): 1006-18.

- Lee, H. and M. J. Caterina (2005). "TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells." Pflugers Archiv-European Journal of Physiology **451**(1): 160-167.
- Lee, S. L., C. C. Kao, et al. (1994). "Antithrombin III enhances the motility and chemotaxis of boar sperm." Comp Biochem Physiol Comp Physiol **107**(2): 277-82.
- Leese, H. J. (1988). "The formation and function of oviduct fluid." J Reprod Fertil **82**(2): 843-56.
- Leunens, L., S. Celestin-Westreich, et al. (2006). "Cognitive and motor development of 8-year-old children born after ICSI compared to spontaneously conceived children." Hum Reprod **21**(11): 2922-9.
- Leunens, L., S. Celestin-Westreich, et al. (2008). "Follow-up of cognitive and motor development of 10-year-old singleton children born after ICSI compared with spontaneously conceived children." Hum Reprod **23**(1): 105-11.
- Lishko, P. V., I. L. Botchkina, et al. "Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm." Nature **471**(7338): 387-91.
- Lishko, P. V., Y. Kirichok, et al. "The control of male fertility by spermatozoan ion channels." Annu Rev Physiol **74**: 453-75.
- Lishko, P. V., Y. Kirichok, D. Ren, B. Navarro, J. J. Chung & D. E. Clapham (2012). "The control of male fertility by spermatozoan ion channels. ." Annu Rev Physiol **74**: 453.
- Lottspeich, F., Engels, J.W., Solodkoff Zettlmeier, L. (2012). "Bioanalytik." Springer Verlag **3. Auflage**.
- Luck, M. R., S. Griffiths, et al. (2001). "Follicular fluid responds endothermically to aqueous dilution." Hum Reprod **16**(12): 2508-14.
- Ludwig, A. K., A. Katalinic, et al. (2009). "Physical health at 5.5 years of age of term-born singletons after intracytoplasmic sperm injection: results of a prospective, controlled, single-blinded study." Fertil Steril **91**(1): 115-24.
- Lundwall, A., A. Giwercman, et al. (2003). "A frequent allele codes for a truncated variant of semenogelin I, the major protein component of human semen coagulum." Mol Hum Reprod **9**(6): 345-50.

- Lyons, E. A., P. J. Taylor, et al. (1991). "Characterization of subendometrial myometrial contractions throughout the menstrual cycle in normal fertile women." Fertil Steril **55**(4): 771-4.
- Maeda, K., Y. Imae, et al. (1976). "Effect of temperature on motility and chemotaxis of Escherichia coli." J Bacteriol **127**(3): 1039-46.
- Mahabadi, V., J. K. Amory, et al. (2009). "Combined transdermal testosterone gel and the progestin nesterone suppresses serum gonadotropins in men." J Clin Endocrinol Metab **94**(7): 2313-20.
- Maher, E. R., L. A. Brueton, et al. (2003). "Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART)." J Med Genet **40**(1): 62-4.
- Makhoul, I. R., A. Tamir, et al. (2009). "In vitro fertilisation and use of ovulation enhancers may both influence childhood height in very low birthweight infants." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **94**(5): F355-9.
- Makler, A., A. Reichler, et al. (1992). "A new model for investigating in real-time the existence of chemotaxis in human spermatozoa." Fertil Steril **57**(5): 1066-74.
- Makler, A., J. Stoller, et al. (1995). "Inability of human sperm to change their orientation in response to external chemical stimuli." Fertil Steril **63**(5): 1077-82.
- Matthews, P. J., Q. Aziz, et al. (2004). "Increased capsaicin receptor TRPV1 nerve fibres in the inflamed human oesophagus." Eur J Gastroenterol Hepatol **16**(9): 897-902.
- Mau Kai, C., K. M. Main, et al. (2007). "Reduced serum testosterone levels in infant boys conceived by intracytoplasmic sperm injection." J Clin Endocrinol Metab **92**(7): 2598-603.
- McLachlan, R. I., L. O'Donnell, et al. (2002). "Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive." J Androl **23**(2): 149-62.
- Menacker, F. and J. A. Martin (2009). "BirthStats: rates of cesarean delivery, and unassisted and assisted vaginal delivery, United States, 1996, 2000, and 2006." Birth **36**(2): 167.
- Meriggiola, M. C., W. J. Bremner, et al. (1997). "An oral regimen of cyproterone acetate and testosterone undecanoate for spermatogenic suppression in men." Fertil Steril **68**(5): 844-50.

- Miles, H. L., P. L. Hofman, et al. (2007). "In vitro fertilization improves childhood growth and metabolism." J Clin Endocrinol Metab **92**(9): 3441-5.
- Mizuno, T., K. Kawasaki, et al. (1992). "Construction of a thermotaxis chamber providing spatial or temporal thermal gradients monitored by an infrared video camera system." Anal Biochem **207**(2): 208-13.
- Mizushima, T., K. Obata, et al. (2006). "Noxious cold stimulation induces mitogen-activated protein kinase activation in transient receptor potential (TRP) channels TRPA1- and TRPM8-containing small sensory neurons." Neuroscience **140**(4): 1337-48.
- Mok, M., D. Abraham, et al. (1986). "Thermotaxis in third and fourth-stage *Dirofilaria immitis* larvae." J Helminthol **60**(1): 61-4.
- Mommers, E., W. M. Kersemaekers, et al. (2008). "Male hormonal contraception: a double-blind, placebo-controlled study." J Clin Endocrinol Metab **93**(7): 2572-80.
- Montell, C. (2001). "Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2001**(90): re1.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2005**(272): re3.
- Montell, C., L. Birnbaumer, et al. (2002). "The TRP channels, a remarkably functional family." Cell **108**(5): 595-8.
- Montell, C., L. Birnbaumer, et al. (2002). "A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels." Mol Cell **9**(2): 229-31.
- Montell, C. and G. M. Rubin (1989). "Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." Neuron **2**(4): 1313-23.
- Moqrich, A., S. W. Hwang, et al. (2005). "Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin." Science **307**(5714): 1468-72.
- Moran, M. M., H. Xu, et al. (2004). "TRP ion channels in the nervous system." Curr Opin Neurobiol **14**(3): 362-9.
- Mortimer, S. T. and M. A. Swan (1995). "Variable kinematics of capacitating human spermatozoa." Hum Reprod **10**(12): 3178-82.

- Muraki, K., Y. Iwata, et al. (2003). "TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes." Circ Res **93**(9): 829-38.
- Nagy, I. and H. P. Rang (1999). "Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin." J Neurosci **19**(24): 10647-55.
- Nakanishi, T., A. Isotani, et al. (2004). "Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice." Biol Reprod **71**(3): 959-65.
- Nathan, J. D., A. A. Patel, et al. (2001). "Capsaicin vanilloid receptor-1 mediates substance P release in experimental pancreatitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281**(5): G1322-8.
- Nieschlag, E. "Clinical trials in male hormonal contraception." Contraception **82**(5): 457-70.
- Nijenhuis, T., J. G. Hoenderop, et al. (2005). "TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate." Pflugers Arch **451**(1): 181-92.
- Nijenhuis, T., J. G. Hoenderop, et al. (2003). "(Patho)physiological implications of the novel epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6." Pflugers Arch **446**(4): 401-9.
- Nijenhuis, T., J. G. Hoenderop, et al. (2003). "Localization and regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 in the kidney." J Am Soc Nephrol **14**(11): 2731-40.
- Nilius, B., J. Prenen, et al. (2001). "Modulation of the epithelial calcium channel, ECaC, by intracellular Ca²⁺." Cell Calcium **29**(6): 417-28.
- Nilius, B., R. Vennekens, et al. (2001). "The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel." J Biol Chem **276**(2): 1020-5.
- Nilius, B. and T. Voets (2005). "TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels." Pflugers Arch **451**(1): 1-10.
- Nilius, B., J. Vriens, et al. (2004). "TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity." Am J Physiol Cell Physiol **286**(2): C195-205.

- Nilius, B., H. Watanabe, et al. (2003). "The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour." *Pflugers Arch* **446**(3): 298-303.
- Nyboe Andersen, A., E. Carlsen, et al. (2008). "Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection marked variability between countries." *Hum Reprod Update* **14**(6): 593-604.
- Nyboe Andersen, A., V. Goossens, et al. (2009). "Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)." *Hum Reprod* **24**(6): 1267-87.
- O'Neil, R. G., X. C. Gao, et al. (2005). "Mechanosensitive nature of the TRPV4 channel in renal epithelia revealed by siRNA gene silencing." *Faseb Journal* **19**(5): A1163-A1163.
- O'Neil, R. G. and S. Heller (2005). "The mechanosensitive nature of TRPV channels." *Pflugers Arch* **451**(1): 193-203.
- Oettle, E. E. and K. Wiswedel (1989). "Changes in sperm motility, morphology and concentration induced by the swim-up procedure." *S Afr Med J* **75**(1): 22-3.
- Oliveira, R. G., L. Tomasi, et al. (1999). "Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids." *J Reprod Fertil* **115**(1): 23-7.
- Olivennes, F. (2005). "Do children born after assisted reproductive technology have a higher incidence of birth defects?" *Fertil Steril* **84**(5): 1325-6; discussion 1327.
- Olson, C. K., K. M. Keppler-Noreuil, et al. (2005). "In vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects." *Fertil Steril* **84**(5): 1308-15.
- Pacey, A. A., N. Davies, et al. (1995). "Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx." *Hum Reprod* **10**(10): 2603-9.
- Pacey, A. A., C. J. Hill, et al. (1995). "The interaction in vitro of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube." *Hum Reprod* **10**(2): 360-6.

- Page, S. T., J. K. Amory, et al. (2008). "Advances in male contraception." Endocr Rev **29**(4): 465-93.
- Parrish, J. J., A. Krogenaes, et al. (1995). "Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development." Theriogenology **44**(6): 859-69.
- Patapoutian, A. (2004). "TRP ion channels and temperature sensation." Molecular Biology of the Cell **15**: 362a-362a.
- Patapoutian, A. (2005). "TRP channels and thermosensation." Chemical Senses **30**: 1193-1194.
- Patapoutian, A., A. M. Peier, et al. (2003). "Thermotrp channels and beyond: Mechanisms of temperature sensation (vol 4, pg 529, 2003)." Nature Reviews Neuroscience **4**(8): 691-691.
- Pedersen, S. F., G. Owsianik, et al. (2005). "TRP channels: an overview." Cell Calcium **38**(3-4): 233-52.
- Peier, A. M., A. Moqrich, et al. (2002). "A TRP channel that senses cold stimuli and menthol." Cell **108**(5): 705-15.
- Peier, A. M., A. J. Reeve, et al. (2002). "A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes." Science **296**(5575): 2046-9.
- Petho, G., I. Izydorczyk, et al. (2004). "Effects of TRPV1 receptor antagonists on stimulated iCGRP release from isolated skin of rats and TRPV1 mutant mice." Pain **109**(3): 284-90.
- Pitchkov, V. (1996). "The Discovery of Ruthenium " Platinum Metals Review **40**(4): 181-188.
- Planells-Cases, R., N. Garcia-Sanz, et al. (2005). "Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia." Pflugers Arch **451**(1): 151-9.
- Ponjaert-Kristoffersen, I., M. Bonduelle, et al. (2005). "International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, in vitro fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments." Pediatrics **115**(3): e283-9.
- Prescott, E. D. and D. Julius (2003). "A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity." Science **300**(5623): 1284-8.

- Puntambekar, P., J. Van Buren, et al. (2004). "Direct interaction of adenosine with the TRPV1 channel protein." J Neurosci **24**(14): 3663-71.
- Qi, H., M. M. Moran, et al. (2007). "All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1219-23.
- Ralt, D., M. Goldenberg, et al. (1991). "Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2840-4.
- Ralt, D., M. Manor, et al. (1994). "Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors." Biol Reprod **50**(4): 774-85.
- Raper, K. B. (1940). "Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*." J.Elisha Mitchell Sci. Soc: 241-282.
- Reeve, L., W. L. Ledger, et al. (2003). "Does the Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion sequence play a role in mediating sperm interaction with the human endosalpinx?" Hum Reprod **18**(7): 1461-8.
- Ren, D., B. Navarro, et al. (2001). "A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility." Nature **413**(6856): 603-9.
- Rimm, A. A., A. C. Katayama, et al. (2004). "A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children." J Assist Reprod Genet **21**(12): 437-43.
- Romundstad, L. B., P. R. Romundstad, et al. (2008). "Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study." Lancet **372**(9640): 737-43.
- Saghatelian, A., M. K. McKinney, et al. (2006). "A FAAH-regulated class of N-acyl taurines that activates TRP ion channels." Biochemistry **45**(30): 9007-15.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T (1989). Molecular cloning. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Saunders, C. I., D. A. Kunde, et al. (2007). "Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood." Mol Immunol **44**(6): 1429-35.
- Savidge, J. R., S. P. Ranasinghe, et al. (2001). "Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root

-
- ganglion neurons and in a cell line expressing the rat vanilloid receptor, VR1." Neuroscience **102**(1): 177-84.
- Sayeed, O. and S. Benzer (1996). "Behavioral genetics of thermosensation and hygrosensation in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6079-84.
- Scherrer, U., S. F. Rimoldi, et al. "Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies." Circulation **125**(15): 1890-6.
- Schieve, L. A., S. F. Meikle, et al. (2002). "Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology." N Engl J Med **346**(10): 731-7.
- Scott, K. A., Y. Yamazaki, et al. "Glucose parameters are altered in mouse offspring produced by assisted reproductive technologies and somatic cell nuclear transfer." Biol Reprod **83**(2): 220-7.
- Seabrook, G. R., K. G. Sutton, et al. (2002). "Functional properties of the high-affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist (4-hydroxy-5-iodo-3-methoxyphenylacetate ester) iodo-resiniferatoxin." J Pharmacol Exp Ther **303**(3): 1052-60.
- Sitzmann, H. (2006). Ruthenium, Thieme Verlag.
- Sitzmann, H. (2009). Ruthenium-Verbindungen, Thieme Verlag.
- Sliwa, L. (1993). "Effect of heparin on human spermatozoa migration in vitro." Arch Androl **30**(3): 177-81.
- Sliwa, L. (1993). "Heparin as a chemoattractant for mouse spermatozoa." Arch Androl **31**(3): 149-52.
- Sliwa, L. (1994). "Chemotactic effect of hormones in mouse spermatozoa." Arch Androl **32**(2): 83-8.
- Sliwa, L. (1995). "Chemotaction of mouse spermatozoa induced by certain hormones." Arch Androl **35**(2): 105-10.
- Smith, G. D., M. J. Gunthorpe, et al. (2002). "TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein." Nature **418**(6894): 186-90.
- Spehr, M., K. Schwane, et al. (2006). "Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm." Mol Cell Endocrinol **250**(1-2): 128-36.

- Spinsanti, G., R. Zannolli, et al. (2008). "Quantitative Real-Time PCR detection of TRPV1-4 gene expression in human leukocytes from healthy and hyposensitive subjects." Mol Pain **4**: 51.
- Squires, J., A. Carter, et al. (2003). "Developmental monitoring of children conceived by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization." Fertil Steril **79**(2): 453-4.
- Stander, S., C. Moormann, et al. (2004). "Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures." Exp Dermatol **13**(3): 129-39.
- Stephoe, P. C. and R. G. Edwards (1978). "Birth after the reimplantation of a human embryo." Lancet **2**(8085): 366.
- Stokes, A. J., C. Wakano, et al. (2005). "Formation of a physiological complex between TRPV2 and RGA protein promotes cell surface expression of TRPV2." J Cell Biochem **94**(4): 669-83.
- Stromberg, B., G. Dahlquist, et al. (2002). "Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study." Lancet **359**(9305): 461-5.
- Suarez, S. S. and H. C. Ho (2003). "Hyperactivated motility in sperm." Reprod Domest Anim **38**(2): 119-24.
- Suarez, S. S. and H. C. Ho (2003). "Hyperactivation of mammalian sperm." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **49**(3): 351-6.
- Suarez, S. S. and A. A. Pacey (2006). "Sperm transport in the female reproductive tract." Hum Reprod Update **12**(1): 23-37.
- Sukcharoen, N., J. Ngeamjirawat, et al. (1994). "A comparison of Makler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement." J Med Assoc Thai **77**(9): 471-6.
- Sun, F., A. Bahat, et al. (2005). "Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants." Hum Reprod **20**(3): 761-7.
- Sunderam, S., J. Chang, et al. (2009). "Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2006." MMWR Surveill Summ **58**(5): 1-25.
- Sutcliffe, A. G., C. J. Peters, et al. (2006). "Assisted reproductive therapies and imprinting disorders--a preliminary British survey." Hum Reprod **21**(4): 1009-11.

- Tanaka, R., K. Muraki, et al. (2008). "TRPV4-like non-selective cation currents in cultured aortic myocytes." J Pharmacol Sci **108**(2): 179-89.
- Tapia, R. and I. Velasco (1997). "Ruthenium red as a tool to study calcium channels, neuronal death and the function of neural pathways." Neurochemistry International **30**(2): 137-147.
- Thompson, J. G., K. L. Kind, et al. (2002). "Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution?" Hum Reprod **17**(11): 2783-6.
- Tominaga, M. and M. J. Caterina (2004). "Thermosensation and pain." J Neurobiol **61**(1): 3-12.
- Tominaga, M., M. J. Caterina, et al. (1998). "The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli." Neuron **21**(3): 531-43.
- Traa, Y. and J. Weitkamp (1998). "Kinetik der Methanisierung von Kohlendioxid an Ruthenium auf Titandioxid." Chemie Ingenieur Technik **70**(11): 1428-1430.
- Traa, Y., Weitkamp, J. (1998). "Kinetik der Methanisierung von Kohlendioxid an Ruthenium auf Titandioxid." Chemie Ingenieur Technik **70**(11): 1428-1430.
- Tresidder, G. C. (1975). "Male fertility." Proc R Soc Med **68**(5): 291-8.
- Trevino, C. L., C. J. Serrano, et al. (2001). "Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm." FEBS Lett **509**(1): 119-25.
- Tur-Kaspa, I. (1992). Pathophysiology of the Fallopian tube. New York, Wiley-Liss.
- Turner, L., A. J. Conway, et al. (2003). "Contraceptive efficacy of a depot progestin and androgen combination in men." J Clin Endocrinol Metab **88**(10): 4659-67.
- Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.
- Vennekens, R., G. Droogmans, et al. (2001). "Functional properties of the epithelial Ca²⁺ channel, ECaC." Gen Physiol Biophys **20**(3): 239-53.

- Vennekens, R., J. G. Hoenderop, et al. (2000). "Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel." *J Biol Chem* **275**(6): 3963-9.
- Villanueva-Diaz, C., J. Arias-Martinez, et al. (1995). "Progesterone induces human sperm chemotaxis." *Fertil Steril* **64**(6): 1183-8.
- Villanueva-Diaz, C., J. Arias-Martinez, et al. (1992). "Novel model for study of human sperm chemotaxis." *Fertil Steril* **58**(2): 392-5.
- Villanueva-Diaz, C., F. Vadillo-Ortega, et al. (1990). "Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa." *Fertil Steril* **54**(6): 1180-2.
- Voets, T., G. Droogmans, et al. (2004). "The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels." *Nature* **430**(7001): 748-54.
- Voets, T., A. Janssens, et al. (2003). "Mg²⁺-dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6." *J Gen Physiol* **121**(3): 245-60.
- Voets, T., J. Prenen, et al. (2001). "CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties." *J Biol Chem* **276**(51): 47767-70.
- Vriens, J., H. Watanabe, et al. (2004). "Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 396-401.
- Wagenaar, K., M. Ceelen, et al. (2008). "School functioning in 8- to 18-year-old children born after in vitro fertilization." *Eur J Pediatr* **167**(11): 1289-95.
- Wagenaar, K., M. M. van Weissenbruch, et al. (2009). "Information processing, attention and visual-motor function of adolescents born after in vitro fertilization compared with spontaneous conception." *Hum Reprod* **24**(4): 913-21.
- Wang, C., Y. G. Cui, et al. (2007). "transient scrotal hyperthermia and levonorgestrel enhance testosterone-induced spermatogenesis suppression in men through increased germ cell apoptosis." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(8): 3292-304.
- Wang, C., G. Cunningham, et al. (2004). "Long-term testosterone gel (AndroGel) treatment maintains beneficial effects on sexual function and

- mood, lean and fat mass, and bone mineral density in hypogonadal men." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(5): 2085-98.
- Wang, C. and R. S. Swerdloff "Hormonal approaches to male contraception." *Curr Opin Urol* **20**(6): 520-4.
- Watanabe, H., J. B. Davis, et al. (2002). "Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives." *J Biol Chem* **277**(16): 13569-77.
- Watanabe, H., J. Vriens, et al. (2003). "Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels." *Nature* **424**(6947): 434-8.
- Weeks, M. E. (1932). "Die Entdeckung der Elemente. VIII. Die Platinmetalle." *Journal of Chemical Bildung* **9**: 1017.
- Wen, J., J. Jiang, et al. "Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis." *Fertil Steril* **97**(6): 1331-7 e1-4.
- Whitaker, B. D. and K. L. Poff (1980). "Thermal adaptation of thermosensing and negative thermotaxis in Dictyostelium." *Exp Cell Res* **128**(1): 87-93.
- Wikstrand, M. H., A. Niklasson, et al. (2008). "Abnormal vessel morphology in boys born after intracytoplasmic sperm injection." *Acta Paediatr* **97**(11): 1512-7.
- Williams, M., C. J. Hill, et al. (1993). "Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation." *Hum Reprod* **8**(12): 2019-26.
- Wu, F. C., T. M. Farley, et al. (1996). "Effects of testosterone enanthate in normal men: experience from a multicenter contraceptive efficacy study. World Health Organization Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility." *Fertil Steril* **65**(3): 626-36.
- Xiao, R. and X. Z. Xu (2009). "Function and regulation of TRP family channels in *C. elegans*." *Pflugers Arch* **458**(5): 851-60.
- Xing, L. F., F. Qu, et al. "The social adaptation of children born after ICSI compared with IVF-conceived children: a study from China." *J Obstet Gynaecol* **31**(8): 751-3.
- Xu, H., M. Delling, et al. (2006). "Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels." *Nat Neurosci* **9**(5): 628-35.

- Xu, H., I. S. Ramsey, et al. (2002). "TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel." Nature **418**(6894): 181-6.
- Xu, L., R. K. Lu, et al. (2000). "Comparative study on efficacy of three sperm-separation techniques." Asian J Androl **2**(2): 131-4.
- Xu, L., A. Tripathy, et al. (1998). "Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels." Ann N Y Acad Sci **853**: 130-48.
- Yan, J., G. Huang, et al. "Birth defects after assisted reproductive technologies in China: analysis of 15,405 offspring in seven centers (2004 to 2008)." Fertil Steril **95**(1): 458-60.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. New York, *Raven Press Ltd*.
- Zachor, D. A. and E. Ben Itzchak "Assisted reproductive technology and risk for autism spectrum disorder." Res Dev Disabil **32**(6): 2950-6.
- Zamir, N., R. Riven-Kreitman, et al. (1993). "Atrial natriuretic peptide attracts human spermatozoa in vitro." Biochem Biophys Res Commun **197**(1): 116-22.
- Zamir, N., G. Skofitsch, et al. (1986). "Distribution of immunoreactive atrial natriuretic peptides in the central nervous system of the rat." Brain Res **365**(1): 105-11.
- Zhang, Y., M. Malekpour, et al. (2007). "Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome." J Med Genet **44**(4): 233-40.
- Zhu, J. L., D. Hvidtjorn, et al. "Parental infertility and cerebral palsy in children." Hum Reprod **25**(12): 3142-5.
- Zigmond, S. H. (1977). "Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors." J Cell Biol **75**(2 Pt 1): 606-16.

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Homey betreut.

7 Danksagung

Die experimentellen Arbeiten wurden im Dermato-Immunologischen und Onkologischen Labor in Kooperation mit der Abteilung für Andrologie an der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey danke ich für die Möglichkeit zur Promotion über dieses interessante Thema. Besonders bin ich ihm für seine gründliche und kritische Durchsicht des Manuskripts und die Unterstützung meiner Arbeit dankbar.

Einen herzlichen Dank möchte ich an Herrn PD Dr. med. Peter Arne Gerber und Dr. rer. nat. Bettina Alexandra Buhren richten, die mich engagiert mit unzähligen Anregungen durch die einzelnen Bestandteile der Arbeit geleitet haben.

Überdies bin ich Dr. rer. nat. Anne Schorr dankbar, die mir stets bei der Organisation und Bewältigung einzelner Aufgaben zur Seite stand.

Danken möchte ich außerdem Dr. rer. nat. Erich Bünemann und Robert Kubitzka, Sabine Kellermann, Dipl.-biol. Astrid Möller sowie Dipl.-biol. Andreas Kislat für die freundliche Einweisung in die verschiedenen Methoden und ihre Hilfestellung im Laboralltag.

Für ein kollegiales Arbeitsklima danke ich den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Homey.

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich schließlich meiner Familie und meinen Freunden aussprechen, die mich in allen Belangen mit Geduld und wertvollen Ratschlägen unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

09.04.2015, Jumana Bus