

# **Aufnahme von Fettsäuren in Spermatozoenlipide von *Sus scrofa domestica* und physiologische Auswirkungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Valentin Svetlichnyy

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. J.-H. Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. A. Herrmann

Gutachter:           1. Prof. Dr. T. Pomorski  
                          2. PD. Dr. J. Schiller  
                          3. Prof. Dr. K. Jewgenow

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2012

## ABSTRACT

This study examines the metabolic incorporation of selected fatty acids into the lipids of porcine spermatozoa and evaluates the physiological state of spermatozoa subsequent to low temperature storage supplementation with selected free fatty acids. Solutions containing lipids and fatty acids have been empirically tested and used as putative cryoprotectants to preserve spermatozoa but the rationale behind this is not yet clear. Thus, the aim of this thesis was to understand the role of fatty acids in relation to the (cryo-)preservation of spermatozoa and successful reproduction in more detail. Preserving spermatozoa between 4 and 6°C leads to a reduction in bacterial contamination and therefore could minimise the need of antibiotic supplements and reduce the development of antibiotic resistance. Nevertheless, for the very cold-sensitive porcine spermatozoa, storage at 6°C leads to a considerable loss of vitality.

In the first part of this study, all lipids and fatty acids present in porcine spermatozoa were analysed using gas chromatography (GC), matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and a detailed lipid databank was created. The main representatives of the polar lipid classes are glycerophospholipids (in particular glycerophosphorylcholine (GPC) and glycerophosphorylethanolamine (GPE)), normally with mainly unsaturated middle and long chained fatty acids and fatty aldehydes. The main representatives of the neutral lipid classes are diacylglycerols (DAG) with middle chain lengths that are usually completely saturated. It was shown, for example, that in the whole GPC class of the porcine spermatozoa, octadecadienoic acid was endogenously present at ca. 15 mol %. Metabolic incorporation of fatty acids into lipids was radiochemically monitored using [<sup>14</sup>C]-octadecadienoic acid in the supplied spermatozoa-preservation medium. These experiments showed that the temperature and the incubation time are particularly important determinants of the metabolic incorporation of this radiochemical in the lipids of spermatozoa. The added fatty acids were incorporated into both the spermatozoas' neutral (1,2-DAG) and the polar lipids (*diacyl*-GPC).

In the second part of this study, the affected lipids were characterised by means of MALDI-TOF-MS and Q-TOF-MS subsequent to the supplementation of uniformly

<sup>13</sup>C-labelled octadecadienoic acid. DAG (18:2 / 18:2), GPC (16:0 / 18:2) and GPC (18:2 / 18:2) could be unequivocally identified. It could be also proven, that a *de-novo* biosynthesis of DAG (18:2 / 18:2) took place. The same results were obtained when spermatozoa were supplemented with hexadecenoic, octadecenoic and octadecatrienoic acids. In contrast, no metabolic incorporation could be monitored when eicosapentaenoic acid (20:5), not endogenously present in the spermatozoa, was supplemented. Finally, it was shown that the physiological state of the spermatozoa, especially those supplemented with endogeneously present fatty acids, led to an enhanced vitality and motility in spermatozoa subsequent to low temperature storage. It was also observed that acrosomal damage was reduced and that hexadecenoic acid significantly stabilised all the vitality parameters. In conclusion, supplementing spermatozoa with selected fatty acids is an effective solution for the storage of spermatozoa at 4 to 6°C and enables antibiotic additives to be reduced.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Morphologie des Säugetierspermatozoons .....	1
1.2	Erwerb der Befruchtungskompetenz von Spermatozoen.....	2
1.3	Kapazitation und Akrosomreaktion .....	5
1.4	Die Lipid- und Fettsäurezusammensetzung der Säugetierspermatozoen	8
1.5	Phospholipidmetabolismus in Säugerspermatozoen .....	11
1.6	Phospholipasen und die zelluläre Signaltransduktion im Spermatozoon	13
1.7	Zusammensetzung der Flüssigkonservierungsmedien.....	16
1.8	Bakterielle Kontamination der porcinen Ejakulate.....	18
<b>2</b>	<b>PROBLEME, ZIELSTELLUNG UND STRATEGIE DER ARBEIT .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
3.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	22
3.2	Software .....	23
3.3	Statistische Auswertungen .....	23
3.4	Gewinnung, Flüssigkonservierung und Supplementierung von Spermatozoen.....	24
3.5	Spermatologische Untersuchungen .....	24
3.5.1	Zellzahlbestimmung .....	25
3.5.2	Plasmamembranintegrität und akrosomaler Status der Zellen.....	25
3.5.2.1	Plasmamembranintegrität .....	25
3.5.2.2	Akrosomaler Status .....	26
3.5.3	Computerunterstützte Motilitätsanalyse (CASA) und Thermoresistenztest	26
3.5.4	Bestimmung der Mitochondrienaktivität und Spermatozoenvitalität .....	27
3.5.5	Zytotoxizitätsassay .....	28
3.5.5.1	Inkubation mit Ethanol.....	28
3.5.5.2	Inkubation mit fettsäurefreiem Rinderserumalbumin .....	28
3.5.5.3	Inkubation mit freien Fettsäuren.....	28
<b>3.6</b>	<b>Lipidanalytik .....</b>	<b>29</b>
3.6.1	Gesamtlipidextraktion.....	29
3.6.1.1	Lipidextraktion aus <i>Spermatozoen</i> und aus Bakterien .....	29
3.6.1.2	Lipidextraktion aus Seminalplasma .....	29
3.6.1.3	Lipidextraktion aus Kieselgel.....	30
3.6.2	Trennung, Visualisierung und Identifizierung einzelner Lipidklassen mittels Dünnschichtchromatographie .....	30
3.6.3	Ermittlung der Trenneigenschaften des Lipidgesamtextraktes porciner <i>Spermatozoen</i> in der dünnschichtchromatographischen Auftrennung .....	31
3.6.3.1	Eindimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung .....	31
3.6.3.2	Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung.....	32

<b>3.7</b>	<b>Massenspektrometrie.....</b>	<b>33</b>
3.7.1	Matrix unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) .....	33
3.7.2	Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (Q-TOF-MS).....	34
3.7.2.1	Auswertung der Spektren und Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen.....	35
<b>3.8</b>	<b>Fettsäurequantifizierung mittels Gaschromatographie .....</b>	<b>35</b>
3.8.1	Transmethylierung von Fettsäuren.....	36
3.8.2	Gaschromatographische Auftrennung von Fettsäuren .....	36
3.8.2.1	Gaschromatographie.....	36
3.8.2.2	Gaschromatographie-Massenspektrometrie .....	37
<b>3.9</b>	<b>Radiochemische Untersuchungen.....</b>	<b>37</b>
3.9.1	Markierungen der Spermatozoen mit [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure.....	37
3.9.2	Markierungen des Seminalplasmas mit [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure .....	38
3.9.3	Markierungen der bakteriellen Kulturen.....	38
3.9.4	Visualisierung radioaktiv markierter Verbindungen .....	39
3.9.5	Identifizierung radioaktiv-markierter Verbindungen .....	39
3.9.6	Puls-Chase-Markierungen mit [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure .....	39
3.9.7	Bestimmung der Stoffmenge von radioaktiv markierten Substraten.....	40
<b>3.10</b>	<b>Untersuchungen mit stabilen Isotopen .....</b>	<b>40</b>
3.10.1	Supplementierung mit [ <sup>12</sup> C]-Fettsäuren .....	41
3.10.2	Supplementierung mit [U- <sup>13</sup> C]-Octadecadiensäure .....	41
<b>3.11</b>	<b>Mikrobiologische Untersuchungen.....</b>	<b>41</b>
3.11.1	Anzucht und Lagerung von Bakterien .....	42
3.11.2	Bakterieller Kontaminationsstatus .....	42
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Lipidzusammensetzung von porcinen Spermatozoen.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Vorkommen von Octadecadiensäure in den Lipiden von porcinen Spermatozoen.....</b>	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>Auswirkung der Fettsäuresupplementierung auf die Lipidzusammensetzung der Spermatozoen.....</b>	<b>57</b>
4.3.1	Analyse der Supplementierungsbedingungen für Octadecadiensäure.....	58
4.3.1.1	Zytotoxizität von Ethanol .....	58
4.3.1.2	Zytotoxizität von Rinderserumalbumin .....	60
4.3.1.3	Zytotoxizität von Octadecadiensäure .....	62
4.3.1.4	Zytotoxizität von Octadecadiensäure unter Bedingungen einer Proteinvermittelten Verabreichung.....	63
4.3.2	Untersuchungen der bakteriellen Metabolisierung von [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure .....	64
4.3.3	Einbau der [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure in porcine Spermatozoenlipide .....	70
4.3.4	Untersuchung des Einbaus von [ <sup>12</sup> C]-, [U- <sup>13</sup> C]-Octadecadiensäure in DAG mittels MALDI-TOF-MS .....	75
4.3.5	Analyse des Einbaus von [ <sup>12</sup> C]-, [U- <sup>13</sup> C]-Octadecadiensäure in DRG und GPC mittels Q-TOF-MS.....	83

# INHALTSVERZEICHNIS

---

4.3.5.1	Analyse des Einbaus von [ $^{12}\text{C}$ ]-, [U- $^{13}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure in GPC mittels Q-TOF-MS.....	84
4.3.5.2	Analyse des Einbaus von [U- $^{13}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure in DRG mittels Q-TOF-MS / MS .....	87
4.3.6	Analyse der Spezifität für den Einbau von Fettsäuren in 1,2-DAG mittels MALDI-TOF-MS.....	93
<b>4.4</b>	<b>Temperatur-, individuums- und seminalplasmaspezifische Einflüsse der metabolischen Aufnahme von Octadecadiensäure.....</b>	<b>96</b>
4.4.1	Nachweis der metabolischen Aufnahme von Octadecadiensäure in <i>diacyl</i> -GPC / 1,2-DAG mittels [1- $^{14}\text{C}$ ]-Kurzzeitmarkierung .....	96
4.4.2	„ <i>Pulse-Chase</i> “ - Untersuchungen der metabolischen Aufnahme von Octadecadiensäure .....	99
4.4.3	Temperatur- und individuumsspezifische Einflüsse auf die metabolische Aufnahme von Octadecadiensäure .....	102
4.4.4	Seminalplasmaspezifische Einflüsse auf die metabolische Aufnahme von Octadecadiensäure in die Lipide .....	107
<b>4.5</b>	<b>Physiologische Auswirkungen der chemischen Supplementierung mit Fettsäuren auf porcine Spermatozoen .....</b>	<b>110</b>
4.5.1	Festlegung der Stichprobengröße für Supplementierungsvarianten, Bestimmung der physiologischen Kriterien.....	111
4.5.2	Verwendete statistische Testverfahren .....	112
4.5.3	Motilitätsanalyse flüssigkonservierter porciner <i>Spermatozoen</i> nach Fettsäuresupplementierung .....	114
4.5.4	Vitalitätsanalyse flüssigkonservierter, porciner <i>Spermatozoen</i> nach Fettsäuresupplementierung .....	121
4.5.5	Untersuchung des akrosomalen Status flüssigkonservierter porciner <i>Spermatozoen</i> nach Fettsäuresupplementierung .....	123
4.5.6	Vergleich der Supplementierungsvarianten untereinander bezüglich ihrer physiologischen Auswirkungen.....	127
<b>4.6</b>	<b>Abschließender Überblick .....</b>	<b>129</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>136</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>150</b>
8.1.1	Auszug aus der Datenbank, die Atommassen der Quasimolekülonen von GPC und DRG.....	150
8.1.2	Deskriptive Statistiken .....	167
8.1.3	Ausführliche Darstellung der Testergebnisse .....	169
8.1.4	Darstellung eines Boxplot-Diagramms .....	180
8.1.5	Anzahl von zu erhebenden physiologischen Parametern.....	181

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>Verzeichnis der Tabellen</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abbildungen</b>	<b>II-IV</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>V-VI</b>

## VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tabelle 1: Phospholipidzusammensetzung von porcinen <i>Spermatozoen</i> nach Ejakulation, nach <i>In-utero</i> und nach <i>In-vitro</i> -Inkubation.....	11
Tabelle 2: Vergleichende Zusammensetzung von Konservierungsmedien für porcine <i>Spermatozoen</i> . ....	17
Tabelle 3: Reagenzien für den Nachweis von bestimmten Lipidklassen auf DC-Platten .....	30
Tabelle 4: Laufmittel für die chromatographische Auftrennung von Lipidgemischen.	31
Tabelle 5: Inkubationsvarianten. Puls-Chase-Markierungen mit [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure .....	40
Tabelle 6: MALDI-TOF-Identifizierung der neutralen Lipide von flüssigkonservierten porcinen <i>Spermatozoen</i> .....	48
Tabelle 7: MALDI-TOF-Identifizierung der polaren Lipide von flüssigkonservierten porcinen <i>Spermatozoen</i> .....	52
Tabelle 8: Gesamtfettsäurezusammensetzung der neutralen Lipide mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	77
Tabelle 9: Berechnete <i>m/z</i> -Werte der Quasimolekülonen von theoretisch vorkommenden GPC im Massenbereich von 818,5 bis 818,8.....	80
Tabelle 10: Berechnete <i>m/z</i> -Werte der Quasimolekülonen von theoretisch vorkommenden Lipiden im Massenbereich von 612,4 bis 612,8 .....	90
Tabelle 11: Ergebnisse des Post-Hoc-Tests. Vergleich der Supplementierungsvarianten untereinander bezüglich ihrer physiologischen Auswirkungen. ....	128
Tabelle 12: Stichprobengröße, Anzahl der zu erhebenden physiologischen Parametern.....	181

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Säugerspermatozoons.....	2
Abbildung 2: Hypothetisches Modell zum Erwerb der Befruchtungsfähigkeit von Säugerspermatozoen - Passage vom Hoden durch den weiblichen Genitaltrakt .....	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Akrosomreaktion .....	5
Abbildung 4: Signaltransduktion während der <i>In-vitro</i> -Kapazitation von Säugerspermatozoen .....	6
Abbildung 5: Struktur von <i>diacyl</i> -, <i>plasmeryl</i> -, und <i>plasmanyl</i> -Glycerophosphocholin der Säugetierspermatozoen, schematische Darstellung .....	9
Abbildung 6: Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide aus der Plasmamembran von porcinen <i>Spermatozoen</i> (Rassen: Landrasse und Duroc) .....	10
Abbildung 7: Modell der Signaltransduktion während der Akrosomreaktion von Säugerspermatozoen. ....	14
Abbildung 8: 1D-dünnschichtchromatographische Auftrennung einer Lipidfraktion von porcinen <i>Spermatozoen</i> . Eine schematische Darstellung. ....	32
Abbildung 9: MALDI-TOF-Massenspektrum von einem Gemisch präparativ gereinigter neutraler Lipide, positive Ionendetektion. ....	34
Abbildung 10: Dünnschichtchromatographische Auftrennung neutraler Lipide eines Gesamtlipidextraktes flüssigkonservierter porciner <i>Spermatozoen</i> .....	44
Abbildung 11: Identifizierung der neutralen Lipide porciner <i>Spermatozoen</i> mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	47
Abbildung 12: Dünnschichtchromatographische Auftrennung polarer Lipide eines Gesamtlipidextraktes flüssigkonservierter porciner <i>Spermatozoen</i> .....	49
Abbildung 13: Identifizierung der polaren Lipide porciner <i>Spermatozoen</i> mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	51
Abbildung 14: Fettsäurezusammensetzung der Hauptlipidklassen flüssigkonservierter porciner <i>Spermatozoen</i> der Rasse Piétrain .....	55
Abbildung 15: Zytotoxizitätsassay nach Inkubation porciner Spermatozoen mit Ethanol .....	59
Abbildung 16: Zytotoxizitätsassay nach Inkubation porciner <i>Spermatozoen</i> mit fettsäurefreiem Rinderserumalbumin.....	61
Abbildung 17: Zytotoxizitätsassay nach Inkubation porciner <i>Spermatozoen</i> mit Octadecadiensäure .....	62

## VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

---

Abbildung 18: Zytotoxizität von Octadecadiensäure unter einer Protein-vermittelten Verabreichung .....	63
Abbildung 19: Chemische Struktur der [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure und $\beta$ -oxidativer Abbau von Fettsäuren. ....	65
Abbildung 20: Metabolischer Einbau der [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure in die Lipide vitaler porciner <i>Spermatozoen</i> und bakterielle Metabolisierung in Glukose-freiem Medium.....	67
Abbildung 21: Metabolischer Einbau der [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure in die Lipide vitaler porciner <i>Spermatozoen</i> und bakterielle Metabolisierung in Glukose-haltigem Medium.....	68
Abbildung 22: Dünnschichtchromatographische Auftrennung porciner Spermatozoenlipide und densitometrische Quantifizierung der Radiosignale nach Markierung mit [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure .....	71
Abbildung 23: 2D-dünnschichtchromatographische Auftrennung polarer Lipide porciner <i>Spermatozoen</i> nach Markierung mit [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure .....	73
Abbildung 24: Identifizierung der Diacylglycerol-Spezies von flüssigkonservierten, porcinen <i>Spermatozoen</i> mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	77
Abbildung 25: Analyse von Glycerophosphocholinen porciner <i>Spermatozoen</i> mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	79
Abbildung 26: MALDI-TOF-Massenspektrum, Massenbereich $m/z=818$ bis $m/z=819$ .....	81
Abbildung 27: Analyse von Glycerophosphocholin porciner <i>Spermatozoen</i> mittels Q-TOF-Massenspektrometrie .....	85
Abbildung 28: MS / MS-Spektrum und Fragmentierungsschema des $[M+NH_4]^+$ -Quasimoleküliions mit $m/z=670$ .....	88
Abbildung 29: MS/MS-Spektren und Fragmentierungsschemata des $[M+NH_4]^+$ -Quasimoleküliions mit $m/z=612$ .....	91
Abbildung 30: Identifizierung verschiedener Diacylglycerol-Spezies von flüssigkonservierten, porcinen <i>Spermatozoen</i> mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	94
Abbildung 31: Einbau von [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure in die Lipide porciner <i>Spermatozoen</i> nach Kurzzeitmarkierung.....	97
Abbildung 32: Auswirkungen unterschiedlicher <i>Chase</i> -Zeiträume auf den Einbau von [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure in die Lipide porciner <i>Spermatozoen</i> .....	100
Abbildung 33: Einbau von [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure in die Lipide porciner <i>Spermatozoen</i> nach Langzeitmarkierung bei 6°C und 17°C .....	103

## VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

---

Abbildung 34: Einbau von [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure in bakterielles GPE und GPI nach Langzeitmarkierung bei 6°C und bei 17°C .....	105
Abbildung 35: Vergleich des metabolischen Einbaus von [1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure in die Lipide flüssigkonservierter, porciner <i>Spermatozoen</i> und in natives porcines Ejakulat.....	108
Abbildung 36: Übersicht der angewendeten statistischen Testverfahren .....	112
Abbildung 37: Untersuchung der Gesamtmotilität porciner <i>Spermatozoen</i> mittels TRT-30 .....	115
Abbildung 38: Untersuchung der Gesamtmotilität porciner <i>Spermatozoen</i> mittels TRT-300 .....	119
Abbildung 39: Untersuchung der Vitalität porciner <i>Spermatozoen</i> mittels Rh123/PI-Markierung.....	122
Abbildung 40: Mikroskopische Untersuchung akrosomdefekter porciner <i>Spermatozoen</i> .....	125
Abbildung 41: Aufnahme von Fettsäuren in die Lipide porciner <i>Spermatozoen</i> und physiologische Auswirkungen.....	130
Abbildung 42: Aufbau eines Boxplot-Diagramms .....	180

## ABKÜRZUNGEN

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen sowie Maßeinheiten nach dem Internationalen Einheitensystem (SI) wurden nicht in das Verzeichnis aufgenommen.

2D-DC	zweidimensionale Dünnschichtchromatographie
<i>amu</i>	Atomare Masseneinheit
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes (bidestilliertes) Wasser
äAM / iAM	äußere / innere Akrosommembran
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> , BSA)
BTS	Beltsville-Thawing-Solution
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CID	kollisionsinduzierte Fragmentierung
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
FAME	Fettsäuremethylester
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC / MS	gekoppelte Gaschromatographie / Massenspektrometrie
<i>gen</i>	Gentamycin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LC / MS	Flüssigkeitschromatographie / Massenspektrometrie
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
$\Delta m$	Massendifferenz
NAR	normaler akrosomaler Rand
PI	Propidiumiodid
PKA / PKC	Proteinkinase-A / Proteinkinase-C
PLase	Phospholipase
PM	Plasmamembran
<i>p</i> -NaCl	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure
Rh123	Rhodamine 123

## ABKÜRZUNGEN

---

RT	Raumtemperatur
$R_f$ -Wert	Retentionsfaktor
TOF	Flugzeit
TRT	Thermoresistenztest
VL-PUFA	langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren
v/v	Volumen pro Volumen
v/v/v	Volumen pro Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
[U- $^{13}\text{C}$ ]	einheitlich $^{13}\text{C}$ markiert

### Abkürzung für Lipide

Die Bezeichnung der Lipide erfolgt in Anlehnung an die Nomenklatur von Gunstone *et al.* (2007) sowie dem Lipidklassifikation-System LIPID MAPS (*Lipid Metabolites and Pathways Strategy*, [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)). Die Fettsäurereste werden als Anzahl ihrer Kohlenstoffatome und der in der Kette enthaltenden Doppelbindungen angegeben. Eine Lipidklasse mit unterschiedlichen Fettsäureresten wird in dieser Arbeit vereinfacht als „Lipidspezies“ bezeichnet. Die *plasmeryl*-, und *plasmanyl*-Lipide einer Lipidklasse werden vereinfacht Ether-Lipide genannt. So werden beispielweise *plasmeryl*-Glycerophosphocholin sowie *plasmanyl*-Glycerophosphocholin zusammenfassend als Ether-Glycerophosphocholine (Ether-GPC) bezeichnet. Diacylglycerophosphat (Phosphatidsäure) wird vereinfacht als Glycerophosphat gekennzeichnet.

GPA	Glycerophosphat (Diacylglycerophosphat, Phosphatidsäure)
GPL	Glycerophospholipid
GPC	Glycerophosphocholin
GPE	Glycerophosphoethanolamin
GPS	Glycerophosphoserin
GPI	Glycerophosphoinositol
GPG	Glycerophosphoglycerol
SGG	Sulfogalactosylglycerolipid (Seminolipid)
DRG	Diradylglycerol
DAG	Diacylglycerol
Cho	Cholesterol
SM	Ceramidphosphocholin (Sphingomyelin)

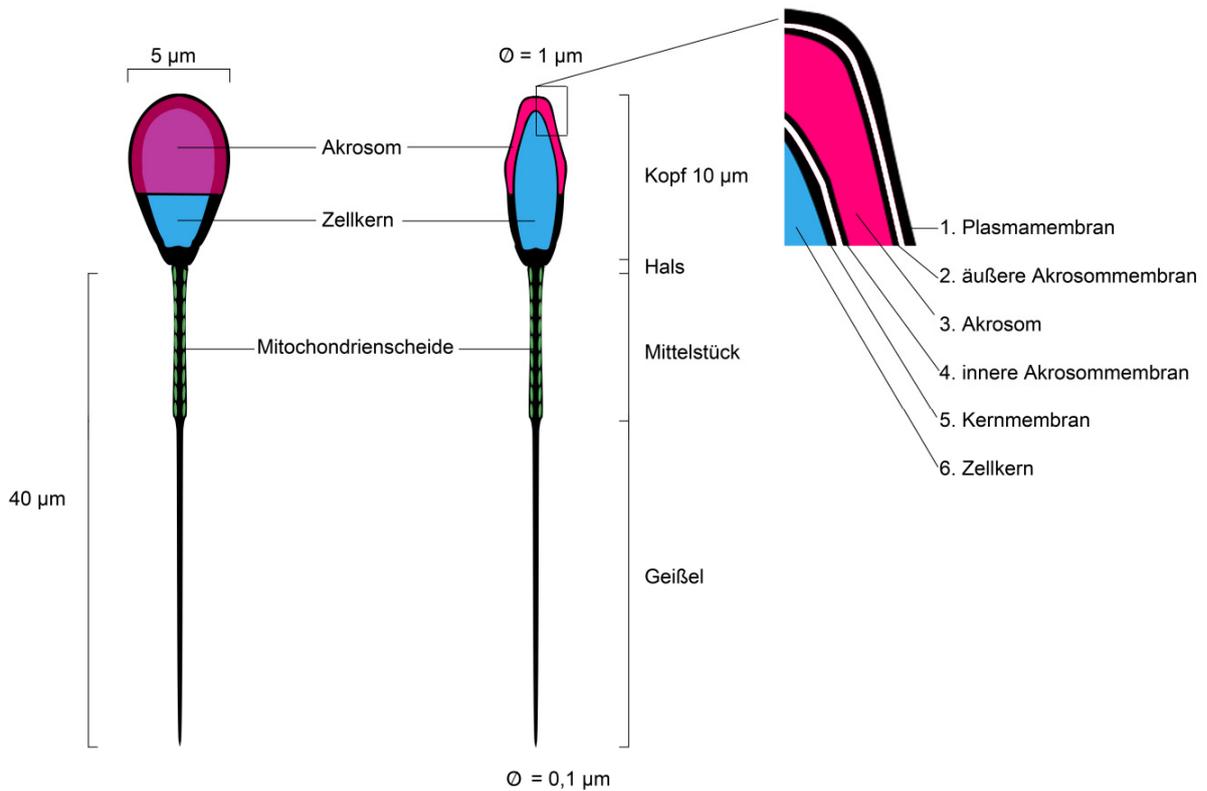
## 1 EINLEITUNG

Die Flüssigkonservierung ist für die künstliche Besamung von landwirtschaftlichen Nutztieren und für den Erhalt von bedrohten Tierarten von entscheidender Bedeutung. Für eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle müssen die *Spermatozoen* über eine gute Motilität, eine funktionsfähige Plasmamembran, sowie ein intaktes Akrosom verfügen. Die porcinen *Spermatozoen* reagieren aufgrund ihrer spezifischen Membraneigenschaften wesentlich empfindlicher als die *Spermatozoen* anderer Tierarten auf eine Niedrigtemperaturlagerung und Kryokonservierung (Parks and Lynch, 1992). Aktuell gilt die Flüssigkonservierung von porcinen *Spermatozoen* mit einer Lagerungstemperatur von 17°C als Standardmethode. Das Konservierungsmedium enthält als essentielle Energiequelle unter anderem Glukose, die in diesem Temperaturbereich auch Bakterien günstige Wachstumsbedingungen bietet (Okazaki *et al.*, 2010). Zur Hemmung des Keimwachstums sind daher im Medium Antibiotika enthalten, was jedoch die Entstehung multiresistenter Erreger begünstigen kann. Trotz der Anwendung optimierter Konservierungsprotokolle werden die physiologischen Parameter von porcinen *Spermatozoen* (Motilität, Vitalität, Membranzusammensetzung) bei niedrigen Temperaturen negativ beeinflusst. Die Entwicklung eines zuverlässigen Flüssigkonservierungsverfahrens bei 6°C könnte eine Verbesserung der hygienischen Verhältnisse bei der künstlichen Besamung ermöglichen.

### 1.1 *Morphologie des Säugetierspermatozoons*

Das Spermium (*Spermatozoon*) ist eine motile männliche Keimzelle, die bei der zweigeschlechtlichen Fortpflanzung mit der weiblichen Eizelle (*Oocyte*) verschmilzt. Im Allgemeinen lässt sich das *Spermatozoon* in Kopf, Mittelstück und Geißel unterteilen (Abb. 1). Der Kopf enthält vor allem den dicht gepackten Zellkern mit einem haploiden Chromosomensatz und das Akrosom, das den vorderen Teil des Zellkerns überdeckt (Rüsse and Sinowatz, 1998). Das Akrosom ist von der akrosomalen Membran umgeben und enthält mehrere Enzyme (u.a. Hyaluronidase, Glycohydrolasen, Proteinasen, Esterasen, Sulfatasen, Phosphatasen und Ca<sup>2+</sup>-abhängige Phospholipasen-C und -A<sub>2</sub>), die bei der Interaktion mit der Eizelle freigesetzt werden (Abou-haila and Tulsiani, 2009). So wird dem *Spermatozoon* die Penetration der *Zona pellucida* der Eizelle ermöglicht. Der Halsbereich ist eine

bewegliche Verbindung zwischen Kopf und Geißel des *Spermatozoons*. Die für die Motilität notwendige Energieversorgung wird durch die im Mittelstück spiralförmig angeordnete Schicht von Mitochondrien gewährleistet. Alle Bereiche eines *Spermatozoons* sind von einer Plasmamembran umgeben.



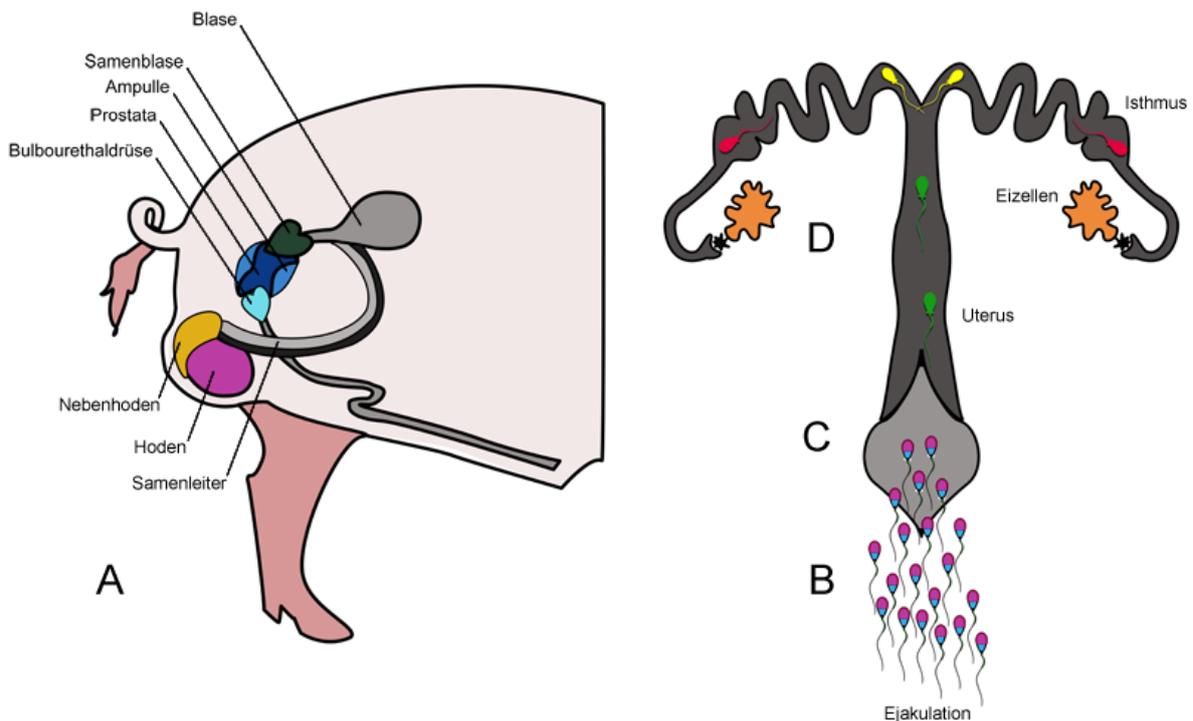
**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Säugerspermatozoons**  
 Frontal-, Lateralansicht und Detaildarstellung.

Die Fertilität von Spermien ist generell von ihrer Fähigkeit abhängig, zur Eizelle zu gelangen, mit dieser zu interagieren und sie zu penetrieren (Medeiros *et al.*, 2002). Ein befruchtungskompetentes *Spermatozoon* sollte daher die Motilität und eine auf die Befruchtung vorbereitete Plasma- sowie Akrosommembran aufweisen.

## 1.2 Erwerb der Befruchtungskompetenz von Spermatozoen

Die Spermatogenese der Säugetiere beginnt unter hormoneller Steuerung nach dem Erlangen der Geschlechtsreife. Wenn die *Spermatozoen* den Hoden verlassen, sind sie noch nicht befruchtungskompetent. Diese Fähigkeit wird in der Regel erst nach einem komplexen, mehrphasigen Reifungsprozess während der Nebenhodenpassage erworben. Im Verlauf der Nebenhodenpassage während der post-testikulären Reifung kommt es zu einer Veränderung der Membranen der *Spermatozoen*.

Das betrifft sowohl die Proteine als auch die, in die Membran integrierte Lipide (Yanagimachi, 1994). Es finden Umbauprozesse der Plasmamembran und Lokalisationsänderungen von integralen oder peripheren Membranproteinen statt (Hammerstedt *et al.*, 1982; Lenzi *et al.*, 2002; Lenzi *et al.*, 2000). Eine wichtige Rolle spielt auch das im Nebenhoden synthetisierte Cholesterin (Cho) (Lindenthal *et al.*, 2001). Dies wird für den Schutz der *Spermatozoen* vor mechanischer Schädigung vom Epithel des Nebenhodens sezerniert und in die Plasmamembran des *Spermatozoons* eingebaut (Seki *et al.*, 1992). Nach der Nebenhodenpassage besitzen die *Spermatozoen* die Fähigkeit, sich an die *Zona pellucida* der Eizelle zu binden. Auch die Fähigkeit sich gerichtet vorwärts zu bewegen wird dabei erworben (Cooper, 1996).



**Abbildung 2: Hypothetisches Modell zum Erwerb der Befruchtungsfähigkeit von Säugerspermatozoen - Passage vom Hoden durch den weiblichen Genitaltrakt**

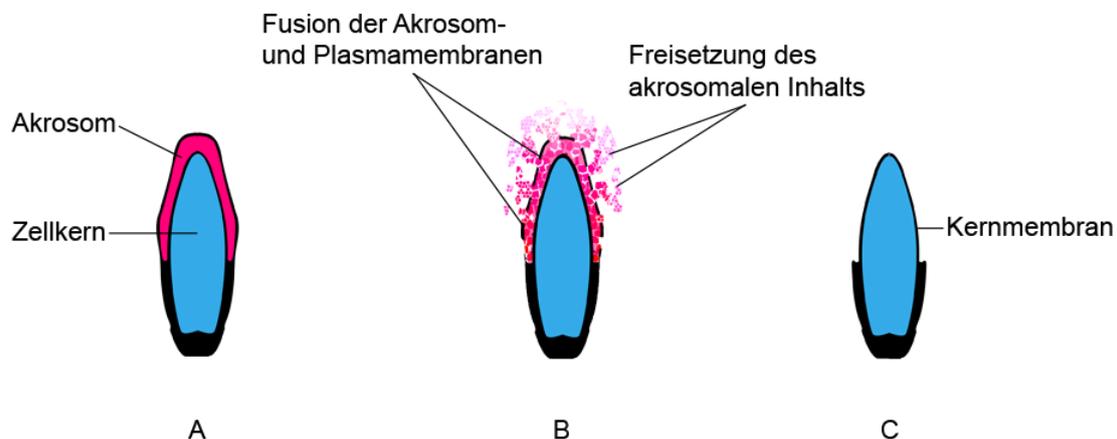
**A.** Post-testikuläre Reifung: Stadium der „*silent fertilization competence*“. **B.** Ejakulation: Kontakt mit sekretorischen Proteinen, Lipoproteinen aus dem männlichen Genitaltrakt (Nebenhoden, Samenleiter, Ampulle, Samenblase, Prostata, Bulbourethraldrüse) **C.** Migration zum Eileiter. **D.** Vor der Ovulation wird der Kapazitationsvorgang bei den *Spermatozoen* induziert. In der Folge werden sie hyperaktiv und lösen sich vom Eileiterepithel. Im Verlauf der Migration vollenden die *Spermatozoen* schrittweise die Kapazitation. So wird die *active fertilization competence*, die sie zur Befruchtung der Eizelle befähigt, erreicht. Ejakulierte (grün), kapazitierte (gelb) und akrosomreagierte (rot) *Spermatozoen* sind markiert. Nach Ekhlesi-Hundrieser (2010), modifiziert.

Erst in diesem Moment spricht man von der sogenannten „*silent fertilization competence*“, der stillen Befruchtungskompetenz (Petrunkina *et al.*, 2007). Ausgereifte *Spermatozoen* bleiben im Nebenhoden bis zur Ejakulation in einem Ruhezustand gespeichert. Somit besteht ein Ejakulat aus *Spermatozoen* und aus weiteren Komponenten, die entweder aus den Hoden und Nebenhoden oder aber aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Ampulle, Samenblasendrüse, Prostata, Bulbourethraldrüse) stammen (Abb. 2, A). Während der Ejakulation werden die *Spermatozoen* mit dem Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, dem Seminalplasma, vermischt und in den weiblichen Genitaltrakt transportiert (Abb. 2, A, B). Versuche, bei denen man die Geschlechtsdrüsen entfernte, um die Notwendigkeit ihres Vorhandenseins für den gesamten Reproduktionsprozess zu überprüfen, reichten von keinerlei Effekt auf die Fertilität (künstliche Befruchtung) bis zu vollständiger Unfruchtbarkeit beim natürlichen Deckakt (Peitz and Olds-Clarke, 1986; Queen *et al.*, 1981). Der Kontakt zum Seminalplasma ist somit ein entscheidender Schritt im Reproduktionprozess. Das Seminalplasma dient als Transportmedium und als Quelle wichtiger an die Spermatozoenmembran assoziierte Substanzen. Es enthält neben essentiellen Ionen und Energiesubstraten auch Proteine sowie Lipide (Gupta *et al.*, 2011). Die im Seminalplasma enthaltenen Lipide und Fettsäuren sind aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften mit Proteinen assoziiert (Tannert *et al.*, 2007a; Tannert *et al.*, 2007b). Die hormonell wirksamen Bestandteile des Seminalplasmas sind unter anderem Prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) und das Östrogen. Das PGF<sub>2</sub>α kommt im Prostatasekret vor und wirkt kontraktil auf die glatte Muskulatur. Es ist davon auszugehen, dass es auch in der Uterusmuskulatur seine Wirkung entfaltet und somit am passiven Spermatozoentransport im weiblichen Genitaltrakt beteiligt ist (Storey, 1995). Das Seminalplasma vermittelt auch die Bindung an das Eileiterepithel. Dies ist essentiell für das Überleben und die Vorbereitung auf den Befruchtungsvorgang (Kapazitation) der *Spermatozoen* im weiblichen Genitaltrakt (Abb. 2, C, D). Bei der *In-vitro*-Inkubation von porcinen *Spermatozoen* mit Eileiterepithelzellen, waren diese *Spermatozoen* nach der Inkubation länger befruchtungskompetent als die unbehandelten Kontrollproben, die ohne Eileiterepithelzellen inkubiert wurden (Suarez *et al.*, 1991).

Die genaueren Funktionen der Bestandteile des Seminalplasmas in den unterschiedlichen Phasen des Reproduktionsgeschehens sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist jedoch, dass sich die Anwesenheit des Seminalplasmas auch bei porcinen *Spermatozoen* positiv auf die Lebensfähigkeit der Zellen auswirkt (Cooper, 1996, 2011; Kraus et al., 2005). Die Bedeutung der lipidhaltigen Substanzen und der relevanten zellulären Prozesse sind daher zu einem wichtigen Gegenstand der reproduktionsmedizinischen Forschung geworden (Gulaya et al., 2001; Vriese and Christophe, 2003).

### 1.3 Kapazitation und Akrosomreaktion

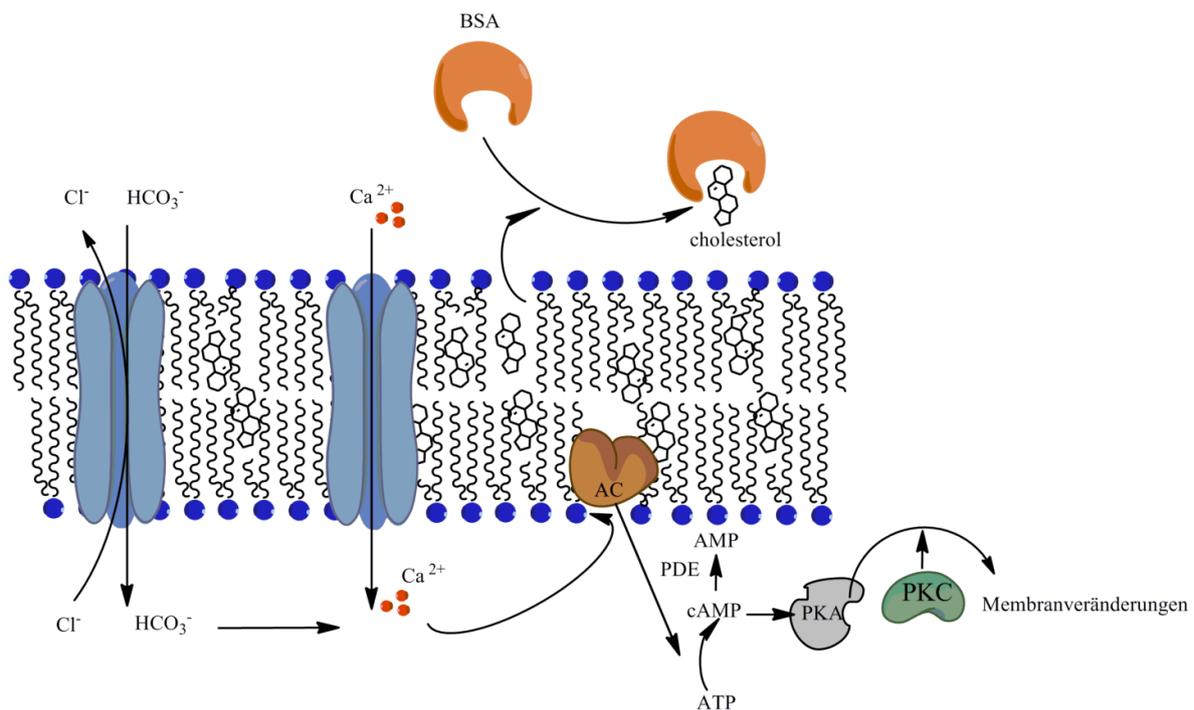
Als Kapazitation wird die physiologische und biochemische Veränderung des *Spermatozoons* im weiblichen Genitaltrakt bezeichnet. Ohne diesen Schritt sind die Akrosomreaktion und die anschließende Befruchtung nicht möglich. Schon in den fünfziger Jahren hat Austin (1952) die Bedeutung der Kapazitation beschrieben. Nach heutigem Kenntnisstand wird diese als ein Destabilisierungsprozess der Zelle angesehen, der für die Akrosomreaktion (Abb. 3 B) essentiell ist (Yanagimachi, 1994).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Akrosomreaktion**

**A.** Intaktes Akrosom **B.** Fortschreitende Akrosomreaktion: Fusion von Plasma- und Akrosommembran, Freisetzung der lytischen Enzyme **C.** Akrosomreagiertes *Spermatozoon*, modifiziert nach Baldi et al. (1996).

Die Veränderungen während der Kapazitation betreffen vor allem die Membranen der *Spermatozoen*, sowie die intrazellulären Ionenkonzentrationen (Bedford and Hoskins, 1990). Wichtige Veränderungen während der Kapazitation sind: Modifikationen der Spermatozoenmembran, erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Einstrom und Veränderungen der Spermatozoenmotilität (Sidhu and Guraya, 1989). Diese Vorgänge sind reversibel (Zaneveld *et al.*, 1991). Die Änderungen der Membranzusammensetzung sowie die Signalmolekülkaskaden (*second messenger pathways*) während der Kapazitation sind bis jetzt noch nicht vollständig beschrieben. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten biochemischen Prozesse während der *In-vitro*-Kapazitation in einem Kapazitationsmedium. Dieses Medium enthält in der Regel Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ), einen Cholesterolakzeptor und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Dapino *et al.*, 2006). Als Cholesterolakzeptoren bei der *In-vitro*-Kapazitation können Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA), Lipoproteine (z.B. *high density lipoproteins*, HDLs) sowie  $\beta$ -Cyclodextrine fungieren (Choi and Toyoda, 1998; Shadan *et al.*, 2004; Visconti *et al.*, 1999a; Visconti *et al.*, 1999b).



**Abbildung 4: Signaltransduktion während der *In-vitro*-Kapazitation von Säugerspermatozoen**  
**BSA:** Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*), **AC:**  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Adenylatcyclase, **ATP:** Adenosintriphosphat, **cAMP:** cyclisches Adenosinmonophosphat, **AMP:** Adenosinmonophosphat, **PDE:** Phosphodiesterase, **PKA:** Proteinkinase-A, **PKC:** Proteinkinase-C  
 Einstrom von Hydrogencarbonat über den  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Antiporter und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem extrazellulären Raum führt zur Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Adenylatcyclase, wobei der intrazelluläre zyklische Adenosinmonophosphat-(cAMP)-Spiegel steigt und Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird. Die Aktivierung der Proteinkinase-C (PKC) durch die PKA kann zur Kapazitation und anschließend zur akrosomalen Exocytose führen. Die Signaltransduktion während der Akrosomreaktion von Säugerspermatozoen ist im Kapitel 1.3 dargestellt.

Durch den Ausstrom von Cho an den Cho-Akzeptor bei der *In-vitro*-Kapazitation werden die Membranen destabilisiert. Ein Einstrom von Hydrogencarbonat über den  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Antiporter und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem extrazellulären Raum führt zur Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Adenylatcyclase, wobei der intrazelluläre zyklische Adenosinmonophosphat-(cAMP)-Spiegel steigt und Proteinkinase-A (PKA) aktiviert wird (Jin *et al.*, 2009). Die Konzentration des intrazellulär vorliegenden cAMP wird durch Phosphodiesterase reguliert. Die Aktivierung der Proteinkinase-C (PKC) durch die PKA bzw. durch die Signalmoleküle („*Second Messenger*“) kann zur Kapazitation und anschließend zur akrosomalen Exocytose, die sogenannte Akrosomreaktion, führen (Baldi *et al.*, 1996; Baldi *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2009; Visconti *et al.*, 1998; Visconti and Kopf, 1998; Visconti *et al.*, 1999c). Bei dieser Reaktion fusioniert die äußere akrosomale Membran mit der darüber liegenden Plasmamembran (Abb. 3 B). Die lytischen Enzyme, die für die Penetration der *Zona pellucida* nötig sind, werden freigesetzt (Yanagimachi, 1994). Zum Auslösen der Akrosomreaktion *in vitro* wird bei porcinen *Spermatozoen* oft ein Calcium-Ionophor oder Lysophosphatidylcholin verwendet (Fazeli *et al.*, 1999; Maxwell and Johnson, 1997).

Neben der Destabilisierung der Membranen von *Spermatozoen* während der Kapazitation, vor dem Beginn der Akrosomreaktion, kommt es zu einer Hyperaktivierung der Zellen am Ende des Kapazitationsvorganges. Eine Besonderheit der Kapazitation ist die Änderung der Bewegungsform (Hyperflagellation) der *Spermatozoen*. Da die Kapazitation *in-vivo* erst im weiblichen Genitaltrakt ausgelöst wird, sind im Seminalplasma "Akrosom stabilisierende Faktoren", auch Dekapazitationsfaktoren genannt, enthalten (Sidhu and Guraya, 1989). Sie tragen entscheidend zum Schutz und zur Stabilisierung der Spermatozoenmembran bei und verhindern die vorzeitige Akrosomreaktion. Der erste Schritt der Kapazitation besteht somit in einer Inaktivierung, oder chemischen Veränderung dieser inhibitorischen Faktoren. An welchem Ort im weiblichen Genitaltrakt die Kapazitation beginnt, ist speziesabhängig. Bei Tierarten mit intrauteriner Ejakulatdeponierung erfolgt die Kapazitation fast ausschließlich im unteren Isthmusabschnitt des Eileiters (Yanagimachi, 1994). Die Dauer der *In-vivo*-Kapazitation ist sowohl spezies- als auch zyklusabhängig und beträgt einige Stunden.

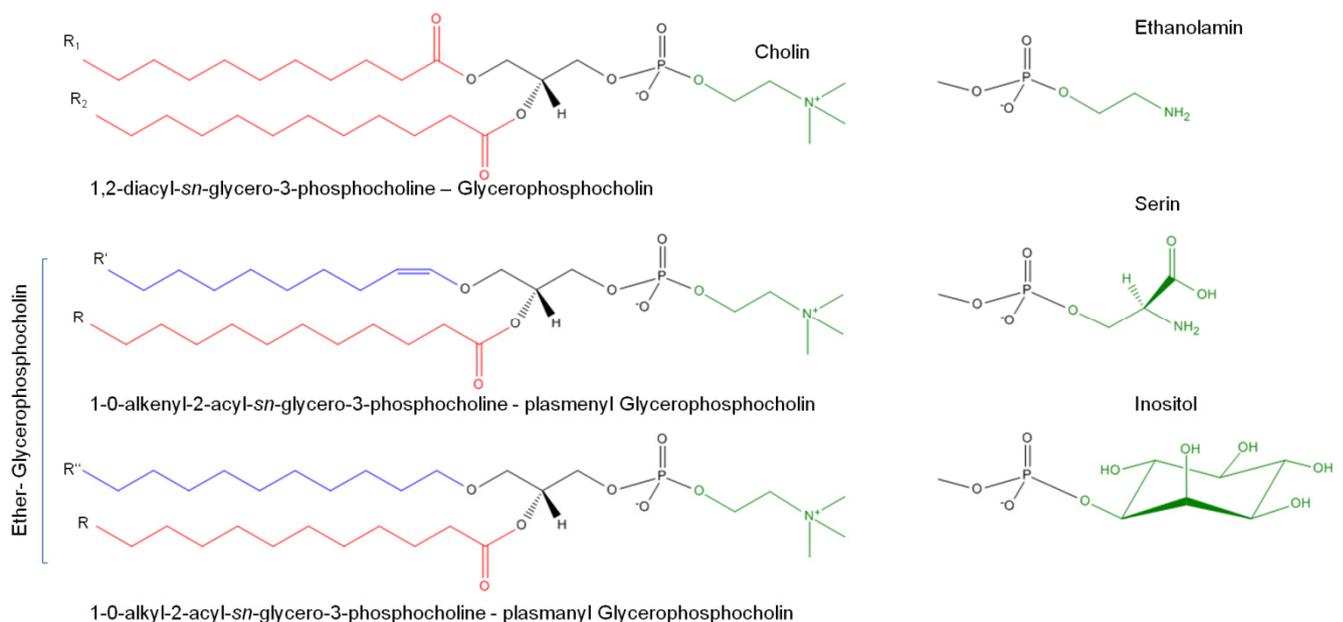
Eileiterepithelzellen sind in der Lage, verschiedene Lipide zu synthetisieren. Die Fettsäuren und Lipide werden in den verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltraktes synthetisiert und sekretiert (Henault and Killian, 1993a, b, c). Die molekularen Wechselwirkungen zwischen *Spermatozoen*, den Sekreten der Eileiterepithelien sowie den lipophilen Komponenten des Seminalplasmas, sind bisher nicht vollständig erforscht (Abou-haila and Tulsiani, 2009; Feki *et al.*, 2004).

### **1.4 Die Lipid- und Fettsäurezusammensetzung der Säugetierspermatozoen**

Die Membranen eines *Spermatozoons* liegen dicht beieinander (Abb. 1 A) und begrenzen unterschiedliche Kompartimente der Zelle: Akrosom, postakrosomaler Abschnitt, Mittelstück, Mitochondrien und Geißel. Dadurch sind die Untersuchungen der Zusammensetzung und Organisation einzelner Membranen erschwert (Kurz, 2005; Mackie *et al.*, 2001). Daher wurden nur die Plasmamembran- sowie die Gesamtlipidzusammensetzung der *Spermatozoen* in der Literatur beschrieben. Es gibt Unterschiede in der Zusammensetzung und Organisation der Membranen zwischen Spezies, Individuen und Ejakulaten. Die Lipidzusammensetzung in *Spermatozoen* ist durch einige besondere, offenbar speziesübergreifende Merkmale gekennzeichnet (Fuchs *et al.*, 2009; Mann and Lutwak-Mann, 1982). Erstens, kommen neutrale Lipide in für somatische Zellen ungewöhnlich hohen Mengen vor, vor allem Diradylglycerole (Nikolopoulou *et al.*, 1985; Zanetti *et al.*, 2010b). Zweitens, ist das Vorkommen von Sulfogalactosylglycerolipid (SGG), auch Seminolipid genannt, spezifisch für die *Spermatozoen* (Kongmanas *et al.*, 2010). Drittens, es kommen am häufigsten die Phospholipide vor. Sie zeigen strukturelle Besonderheiten; neben den estergebundenen Fettsäureresten kommen Glycerophospholipide (GPL) mit ethergebundenen Alkanen und Alkenen vor. Bei den felines *Spermatozoen* kommen Glycerophospholipide (GPL) überwiegend mit estergebundenen Fettsäureresten vor (Fuchs *et al.*, 2009). Bei den anderen Tierarten machen die Ether-GPL bis zu 50 Prozent der GPL aus (Aveldano *et al.*, 1992; Clegg and Foote, 1973; Evans *et al.*, 1980; Lessig *et al.*, 2004; Mann and Lutwak-Mann, 1981; Mann and Lutwak-Mann, 1982; Neill and Masters, 1973; Nikolopoulou *et al.*, 1985; Schiller *et al.*, 2003; Selivonchick *et al.*, 1980). Bei Ether-GPL wird zwischen Molekülen mit einer einfachen Etherbindung (*2-acyl-1-alkyl*-Glycerophospholipide, *plasmanyl lipid*) und

## EINLEITUNG

Molekülen mit einer Enoletherbindung (*2-acyl-1-alkenyl*-Glycerophospholipide, *plasmeryl lipid*, dt. Plasmalogen) an der C-1-Position des Glycerols unterschieden. Der Fettsäurerest an den C-2-Positionen des Glycerols ist sowohl für *plasmeryl*- als auch für *plasmanyl*-Lipide über eine Esterbindung wie bei *diacyl*-GPL verknüpft (Gunstone *et al.*, 2007). Die Ether-Glycerophospholipide der Säugetierspermatozoen besitzen überwiegend als Kopfgruppe Cholin oder Ethanolamin (Evans *et al.*, 1980). Die Unterschiede zwischen Glycerophospholipiden und Ether-Glycerophospholipiden sind in Abbildung 5 beispielhaft für Glycerophosphocholin und Ether-CPC dargestellt.



**Abbildung 5: Struktur von *diacyl*-, *plasmeryl*-, und *plasmanyl*-Glycerophosphocholin der Säugetierspermatozoen, schematische Darstellung**

Acylreste von Fettsäuren sind rot dargestellt (R); diese sind in der Regel durch die langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren gekennzeichnet.

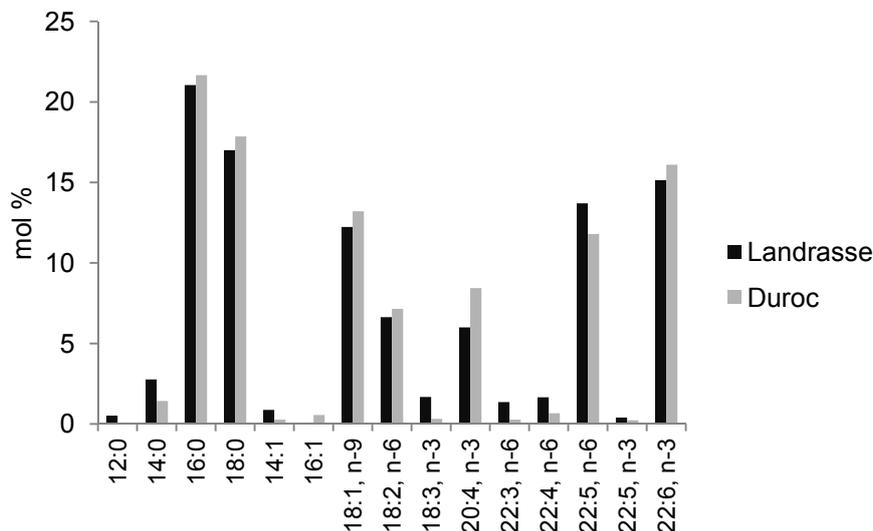
Alkenyl- sowie Alkylreste sind blau markiert (R' und R''); diese sind in der Regel durch ein Alken (R': meist 16:1 oder 18:1) sowie ein Alkan (R'': meist 16:0 oder 18:0) gekennzeichnet.

Die Glycerophospholipide unterscheiden sich im Aufbau ihrer Kopfgruppen (grün dargestellt).

Etherlipide sind Membran-Bestandteile der Säugetierspermatozoen und können als Signalmoleküle in der Neuro- sowie Spermatogenese eine wichtige Rolle ausüben. Durch die Untersuchungen von plasmalogendefizienten Mäusen konnten unter anderem eine Sterilität bei männlichen Tiere beobachtet werden (Rodemer *et al.*, 2003a; Rodemer *et al.*, 2003b).

Die Glycerophospholipide (GPL) sind durch einen großen Anteil an langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren gekennzeichnet. Die *plasmeyl*-GPL sind in der Regel durch ein Alken (meist 16:1 oder 18:1) und die *plasmanyl*-GPL durch ein Alkan (meist 16:0 oder 18:0) an der C-1-Position und eine, mehrfach ungesättigte Fettsäure (20:4, 22:5, 22:6) an der C-2-Position des Glycerolgerüsts charakterisiert (Buhr *et al.*, 1994; Parks and Lynch, 1992).

Die Untersuchungen der Fettsäurezusammensetzung von GPL zeigten, dass in der Plasmamembran porciner *Spermatozoen* unterschiedlicher Rassen mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von maximal 22 C-Atomen sowie Palmitin-, Stearin-, und Ölsäure dominieren (Abb. 6). Das Vorkommen von Palmitoleinsäure konnte hingegen nicht beobachtet werden (Waterhouse *et al.*, 2006).



**Abbildung 6: Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide aus der Plasmamembran von porcinen *Spermatozoen* (Rassen: Landrasse und Duroc)**

Die Werte wurden durch Transmethylierung von Fettsäuren und ihrer Auftrennung über Gaschromatographie ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert in [mol%] von zwölf unabhängigen Bestimmungen. Die Standardabweichung lag bei allen Proben unter 1 [mol%]. Die Fetaldehyde von Ether-GPL werden unter diesen Bedingungen nicht detektiert.

Aus Waterhouse *et al.* (2006), modifiziert.

Das Vorkommen von langkettigen (bis hin zu 34:6), mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*very long chain polyunsaturated or polyenoic fatty acids*, VLC-PUFA) in den Lipiden porciner sowie den anderen Säugetierspermatozoen wurde mehrfach beschrieben (Poulos *et al.*, 1986; Robinson *et al.*, 1992; Zanetti *et al.*, 2010a; Zanetti *et al.*, 2010b)

### 1.5 Phospholipidmetabolismus in Säugerspermatozoen

Die Fähigkeit der Säugetierspermatozoen Fettsäuren zu verwerten wurde bereits von (Hamilton and Olson, 1976; Neill and Masters, 1971, 1972, 1973; Terner and Korsh, 1962) beobachtet. Die Bedeutung der Lipidsynthese für den Metabolismus der *Spermatozoen* schien damals im Vergleich mit den somatischen Zellen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Bei den Untersuchungen der GPL von frisch ejakulierten sowie von über mehrere Tage *in-vitro* inkubierten porcinen *Spermatozoen* konnten keine nennenswerte Veränderungen der GPL-Zusammensetzung festgestellt werden. Während der Inkubation der *Spermatozoen* mit den oviduktalen Sekreten wurde hingegen eine signifikante Veränderung vor allem bei *diacyl*-GPC beobachtet (Evans *et al.*, 1980). Tabelle 1 gibt einen Überblick über das Vorkommen von unterschiedlichen GPL-Klassen in porcinen *Spermatozoen* sowie deren Veränderung während der *In-vitro*-Inkubation und der Inkubation zusammen mit den Sekreten der Gebärmutter (*In-utero*-Inkubation).

**Tabelle 1: Phospholipidzusammensetzung von porcinen *Spermatozoen* nach Ejakulation, nach *In-utero* und nach *In-vitro*-Inkubation**

Phospholipidklassen	Inkubation					
	A. ( ejakulierte )		B. ( <i>in-utero</i> )		C. ( <i>in-vitro</i> )	
Glycerophosphocholin	32.8	(0.7)	36.4	(1.7)	32.2	(1.2)
<i>diacyl</i> -	7.2	(0.6)	10.2	(0.6)	6.8	(1.3)
<i>plasmeryl</i> -	7.6	(1.1)	7.1	(0.7)	6.6	(0.2)
<i>plasmanyl</i> -	18.0	(1.3)	19.0	(0.8)	18.8	(1.9)
Glycerophosphoethanolamin	18.5	(0.6)	19.2	(1.2)	17.5	(0.9)
<i>diacyl</i> -	2.0	(0.3)	2.5	(0.2)	1.6	(0.2)
<i>plasmeryl</i> -	7.4	(0.8)	7.5	(0.6)	6.4	(0.5)
<i>plasmanyl</i> -	9.1	(0.4)	9.2	(0.7)	9.4	(1.1)
Phosphosphingolipid	7.0	(1.7)	8.0	(1.9)	7.4	(1.8)
Glycerophosphoglycerophosphoglycerol	3.6	(0.3)	4.4	(0.7)	3.8	(0.5)
Glycerophosphoinositol	1.5	(0.2)	1.9	(0.5)	1.5	(0.1)
Diacylglycerophosphat	1.0	(0.3)	1.0	(0.2)	1.0	(0.3)
Glycerophosphoserin	0.8	(0.2)	1.0	(0.4)	0.5	(0.1)
Glycerophosphoglycerol	0.5	(0.1)	0.5	(0.2)	0.4	(0.2)
Phospholipid insgesamt	65.7	(2.0)	72.4	(4.5)	64.4	(3.3)

Die Werte sind in  $\mu\text{g Lipid} / 10^9 \text{ Spermatozoen}$  für frisch ejakulierte (A), *in-utero*-inkubierte (B) sowie *in-vitro*-inkubierte Varianten (C) dargestellt; Standardabweichungen in Klammern dargestellt,  $n=4$ ; Die Quantifizierung erfolgte über Dünnschichtchromatographie mit anschließender Phosphat-Bestimmung. Aus Evans *et al.* (1980), modifiziert.

Ein *de-novo*-Biosyntheseweg von GPL wurde bereits mittels radioaktiv markierter GPL-Vorstufen (Fettsäuren, Glycerin und Cholin) beschrieben (Roldan and Harrison, 1992; Roldan and Murase, 1994; Vazquez and Roldan, 1997a, b). Der Einbau von Substraten fand zuerst in Diacylglycerophosphat (DGP) dann in 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG) und schließlich in Glycerophosphocholin (GPC) statt.

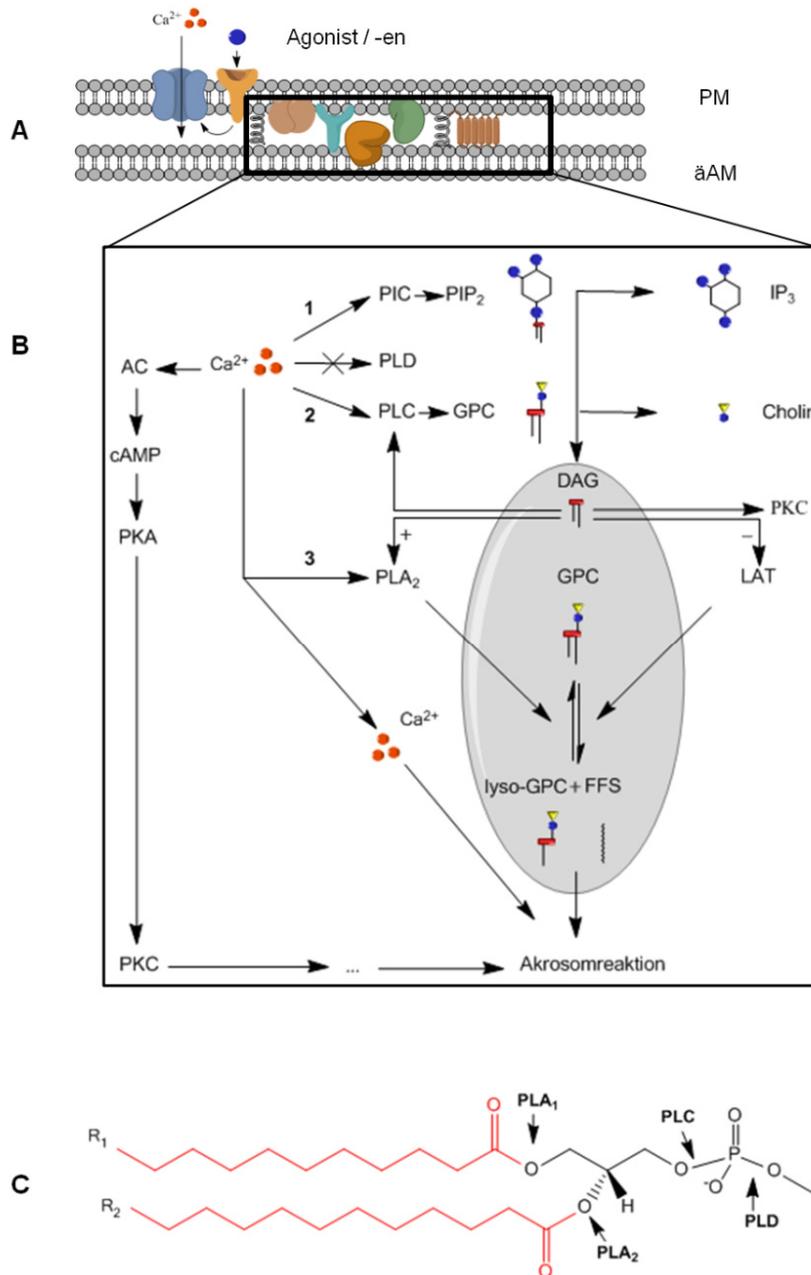
Auffallend war, dass nicht alle markierten DAG- in die GPC via Cholinphosphotransferase, welche GPC-Synthese über den Kennedy-Weg (Bishop and Bell, 1988; Hjelmstad and Bell, 1991) katalysiert, umgewandelt waren. In somatischen Zellen befinden sich Enzyme, die eine Verwertung von DAG für eine *de-novo* GPC-Synthese ermöglichen. So sind z.B. Choline-Phosphate-Cytidylyl-Transferase und Choline-Phosphotransferase in den somatischen Zellen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Da die *Spermatozoen* kein ER besitzen, ist die genauere Lokalisierung der Enzyme, welche am Lipidstoffwechsel beteiligt sind, unklar. Die Autoren vermuten, dass diese entweder im Cytosol des *Spermatozoons*, in der Plasmamembran oder in den Golgi-Derivaten der äußeren akrosomalen Membran lokalisiert sind (Roldan and Shi, 2007).

Durch radiochemische Supplementierungsuntersuchungen mit Palmitinsäure bei 37°C wurde gezeigt, dass zwei unterschiedliche DAG-Pools entstehen. Etwa 90% der DAG-Spezies enthielten sowohl in der C-1-Position als auch in der C-2-Position des Glycerols gesättigte Fettsäuren (*double saturated* DAG, DS-DAG). Die übrigen 10% der DAG-Spezies enthielten eine gesättigte FS in der C-1-Position und eine ungesättigte Fettsäure in der C-2-Position (*single unsaturated* DAG, SU-DAG). Beim Absenken der Inkubationstemperatur von 25°C auf 17°C bei unveränderter Inkubationsdauer, reduzierte sich das Verhältnis von DS-DAG auf 65%, und von SU-DAG erhöhte es sich entsprechend etwa auf 35% (Vazquez and Roldan, 1997b). Die Menge der metabolisch in die Lipide eingebauten Palmitinsäure war bei DS-DAG und bei GPC nahezu gleich. Dies stimmte mit der bekannten Substratpräferenz der Cholin-Phosphotransferase für SU-DAG überein (Ansell and Spanner, 1982). Diese Beobachtung zeigte auch, dass sich die Cholin-Phosphotransferase nahezu im Gleichgewicht befindet (Pelech and Vance, 1984; Shears, 1993). Die Markierungsexperimente mit einer ungesättigten 20:4-Fettsäure zeigten sowohl bei 25°C, als auch bei 17°C eine viel schnellere Fettsäure-Aufnahme im Vergleich zur 16:0 in den freien Fettsäure-Pool (FFS-Pool). Es begann nahezu gleichzeitig der

metabolische Einbau der Fettsäure in GPA und in 1,2-DAG. Erst nach 24 Stunden Inkubation war das Signal von den markierten GPC ca. vierfach höher als das 1,2-DAG-Signal, wobei sich der Plateauwert nach 24 h bei 25°C und nach 48 h bei 17°C einstellte. Die Autoren vermuten, dass es sich um einen *de-novo* Syntheseweg von GPC durch einen direkten Einbau von 20:4 in der GPC via Lysophosphatid Acyltransferase handelte. Somit haben sowohl das Substrat, als auch die Dauer der Inkubation und die Temperatur einen wichtigen Einfluss auf die Erhaltung des Gleichgewichts zwischen den GPL- und DAG-Pools (Vazquez and Roldan, 1997b).

### **1.6 Phospholipasen und die zelluläre Signaltransduktion im Spermatozoon**

Die Kapazitation, die Akrosomreaktion und die Hyperflagellation der *Spermatozoen* sind erst nach dem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem extrazellulären Raum oder aus intrazellulären Speichern möglich (Abb. 4, Abb. 7).  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besitzen eine Funktion als intrazelluläre Signalüberträger („*second messenger*“) und spielen neben der Aktivierung von Adenylatcyclase auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Phospholipasen. Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird in der Regel über eine Agonist-Rezeptor-Wechselwirkung in den *Spermatozoen* reguliert. Als Agonisten für die rezeptorvermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Säugetierspermatozoen sind u.a. *epidermal growth factor*, *atrial natriuretic peptide*, Prolactin, Interleukin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure zu nennen. Bei Untersuchungen an *in-vitro*-kapazitierten *Spermatozoen* wurde gezeigt, dass die Synthese von DAG einen Einfluss auf die Kapazitation haben kann (Vazquez and Roldan, 1997a). Diese Untersuchungen an nicht kapazitierten *Spermatozoen* mit unterschiedlichen Agonisten zeigten einen Zusammenhang zwischen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, der Aktivität von Phospholipasen und der akrosomalen Exozytose (Abb. 7, A). Durch die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen-Phospholipasen werden zahlreiche Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt. Dies ermöglicht am Ende des Kapazitationvorganges die Fusion der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran und somit die Freisetzung der akrosomalen Enzyme (Abb. 7, B-C).



**Abbildung 7: Modell der Signaltransduktion während der Akrosomreaktion von Säugerspermatozoen.**

**Zusammenhang: Phospholipasen und die Entstehung intrazellulärer Signalüberträger;** Erläuterungen im Text.

**A.** Die genaue Lokalisierung der Enzyme, welche am Lipidstoffwechsel in Säugerspermatozoen beteiligt sind, ist unklar. Man vermutet jedoch die Plasmamembran (PM) bzw. Golgi-Derivate in der äußeren akrosomalen Membran (äAM). **Agonisten:** Progesteron, *epidermal growth factor* (EGF), *atrial natriuretic peptide* (ANP), Prolactin, Interleukin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA).

**B.** Enzyme, Substrate und Produkte **AC:**  $Ca^{2+}$ -abhängige Adenylatcyclase, **cAMP:** cyclisches Adenosinmonophosphat, **PKA:** Proteinkinase-A, **PKC:** Proteinkinase-C, **PIC:** glycerophosphoinositid-spezifische Phospholipase-C, **PLD:** Phospholipase-D, **PLA<sub>2</sub>:** Phospholipase-A<sub>2</sub>, **LAT:** Lysophosphatid Acyltransferase, **GPC-PLC:** glycerophosphatidylcholin-spezifische Phospholipase-C, **PIP<sub>2</sub>:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, **IP<sub>3</sub>:** 1,4,5-triphosphat, **DAG:** 1,2-Diacylglycerol, **GPC:** Glycerophosphocholin, **lyso-GPC:** lyso-Glycerophosphocholin, **FFS:** freie Fettsäuren.

**C.** Angriffsorte der Phospholipasen an einem Beispiel für *diacyl*-Glycerophosphocholinmolekül, schematische Darstellung. Die Acylreste von Fettsäuren sind rot dargestellt (R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>).

Nach Roldan and Shi (2007), Vazquez and Roldan (1997b), modifiziert.

Diese molekularen Vorgänge bilden die Basis für die Befruchtungskompetenz des *Spermatozoons*. Zusammenfassend lässt sich ein Modell der Signaltransduktionsprozesse und der daran beteiligten intrazellulären Signalüberträger in Säugerspermatozoen während der Kapazitation erstellen (Roldan, 1998; Roldan and Shi, 2007). Nach dem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem extrazellulären Raum bzw. intrazellulären Speichern werden neben der Adenylatcyclase auch Phospholipasen aktiviert (Abb. 7, B). So wurden für die Säugerspermatozoen phosphoinositidspezifische Phospholipase-C (PIC-PLC), glycerophosphatidylcholinspezifische PLC (GPC-PLC), Phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) und Phospholipase D (PLD) beschrieben (Roldan and Shi, 2007). Die Phospholipase-C (PLC) ist eine Hydrolase, deren Produkt 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG) ist (Abb. 7, C). Zwei Hauptgruppen sind durch ihre Substratspezifität gekennzeichnet: Glycerophosphoinositol (GPI) und Glycerophosphocholine (GPC). Sowohl PIC-PLC als auch GPC-PLC sind für die Entstehung von einer Vielzahl der DAG-Spezies in *Spermatozoen* zuständig. PIC-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat erzeugt 1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und DAG (Ribbes *et al.*, 1987). Die Hydrolyse von Polyphosphoinositid findet nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen statt. Die Untersuchungen von PIC an den *Spermatozoen* in  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medien, sowie die Studien mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanalblocker lassen einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher in den *Spermatozoen* vermuten. Die genauere Lokalisation ist jedoch unbekannt. Es wird das Akrosom vermutet. Durch die GPC-PLC wird das Phosphatidylcholin, in Cholin-Phosphat und DAG gespalten. Die GPC-PLC ist das wichtigste Enzym für die Entstehung von DAG aus GPC in somatischen Zellen. Auch die Untersuchungen an humanen *Spermatozoen* zeigten, dass sowohl während der *In-vitro*-Kapazitation als auch in Anwesenheit von den Agonisten für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine Entstehung von DAG zu beobachten ist. Die intrazelluläre Lokalisation von GPC-PLC ist mit großer Wahrscheinlichkeit die akrosomale Region der *Spermatozoen* (Roldan and Shi, 2007). Auch das Vorkommen von GPC-PLC im Seminalplasma wurde berichtet. Die Phospholipase-D (PLD) mit Ausnahme von Seeigelspermatozoa, scheint bei der Entstehung von DAG in Säugerspermatozoen keine signifikante Rolle zu spielen (Roldan and Shi, 2007). Die Hydrolyse von GPL durch  $\text{PLA}_2$  erzeugt freie Fettsäuren und Lysoglycerophospholipide.

Diese fungieren wiederum als Substrate für die Erzeugung weiterer Metabolite oder führen zur Membranendestabilisierung und schließlich zur Fusion der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran und somit zur Freisetzung der akrosomalen Enzyme.

Durch den Einsatz von DAG-Lipasen, DAG-Kinasen sowie von deren Inhibitoren konnten Roldan and Harrison (1992) die Bedeutung von DAG bei der Kapazitation sowie bei der Akrosomreaktion nachweisen. DAG aktivierte in *Spermatozoen* Proteinkinase-C und PLA<sub>2</sub> und hatte auch einen positiven Rückkopplungseffekt auf GPC-PLC (O'Toole *et al.*, 1996; Roldan and Fragio, 1994; Roldan *et al.*, 1994; Roldan and Shi, 2007). DAG fundieren, neben ihrer Funktion als „*second messenger*“, auch als Substrat für die Erzeugung anderer aktiver Metabolite wie Diacylglycerophosphat oder Monoacylglycerol. Sowohl die Umwandlung von DAG in Diacylglycerophosphat über DAG-Kinase, als auch der DAG Katabolismus zu Monoacylglycerol über DAG-Lipase, spielten eine untergeordnete Rolle in der Signaltransduktionskaskade von *Spermatozoen*. Durch den Einsatz von Inhibitoren von DAG-Lipasen und DAG-Kinasen konnte gezeigt werden, dass DAG und nicht die abgeleiteten Metabolite wichtig für die Kapazitation und Akrosomreaktion sind. Desweiteren wurde gezeigt, dass während der akrosomalen Exocytose DAG als Vorstufe für die GPC Synthese fundiert. Dies war ein Beweis dafür, dass die porcinen *Spermatozoen* in der Lage sind, eine aktive *de-novo*-GPC-Synthese durchzuführen.

### **1.7 Zusammensetzung der Flüssigkonservierungsmedien**

Bei der Flüssigkonservierung stellt jedes Medium den *Spermatozoen* bestimmte Komponenten zur Verfügung. Diese sind eine Energiequelle (Glukose), die den physiologischen *pH*-Wert (Bikarbonat) sowie den osmotischen Druck (*NaCl*, *KCl* sowie Glukose) regulieren. Die Bestandteile eines Flüssigkonservierungsmediums dürfen nicht die Befruchtungskompetenzkriterien der *Spermatozoen* wie Motilität, Membraneigenschaften, Akrosomstatus, Enzymausstattung, Fähigkeit zur Kapazitation und Akrosomreaktion negativ beeinflussen. Es wird allgemein zwischen Kurzzeit- und Langzeitkonservierungsmedien unterschieden. Das Kurzzeitkonservierungsmedium ermöglicht, die *Spermatozoen* einer bestimmten Tierart, für einen Zeitraum von wenigen Tagen flüssig konservierbar zu machen.

## EINLEITUNG

Die typischen Inhaltsstoffe von Kurzkonservierungsmedien für porcine *Spermatozoen* (BTS, Kiev, IVT) sind exemplarisch in der Tabelle 2 dargestellt.

Diese Medien enthalten alle notwendigen Substanzen, die für das Überleben von Zellen erforderlich und an den Elektrolytgehalt der porcinen *Spermatozoen* angepasst sind. Stoffwechseluntersuchungen zufolge wird Glukose während der Langzeitkonservierung verbraucht und Laktat produziert. Dieser Prozess hat einen entscheidenden Einfluss auf die osmotischen Eigenschaften des Mediums. Daher ist eine weitere essentielle Komponente notwendig, um den physiologischen *pH*-Wert über den gesamten Lagerungszeitraum aufrechtzuerhalten. In der Regel werden dafür Bikarbonate verwendet.

**Tabelle 2: Vergleichende Zusammensetzung von Konservierungsmedien für porcine Spermatozoen.**

(g/l)	Kurzzeitmedium bis 72 Std.			Langzeitmedium bis 240 Std.				
	IVT	Kiew	BTS	Zorleso	Zorpva	Readig	Modena	Androhep
Glukose	3	60	37	11.5	11.5	11.5	25	26
Natriumcitrat	24.3	3.7	6.0	11.7	11.65	11.65	6.9	8.0
EDTA		3.7	1.25	2.3	2.35	2.35	2.25	2.4
Natriumhydrogencarbonat	2.4	1.2	1.25	1.25	1.75	1.75	1.0	1.2
Kaliumchlorid	0.4		0.75			0.75		
Acetylcystein	0.05							
HEPES								9.0
BSA				5.0			3.0	2.5
TRIS				6.5	5.5	5.5	5.65	
Zitronensäure				4.1	4.1	4.1	2.0	
Cystein				0.1	0.7	0.7	0.05	
Trehalose						1		
PVA					1	1		
mOSm	290	380	330	240	275	300	282	309
pH		7.2	7.2				6.9	6.8

IVT (Du Mesnil du Buisson and Dauzier, 1959), BTS (Pursel and Johnson, 1975), Kiew (Plisko, 1965), Zorleso (Gottardi L., 1980), Zorpva (Cheng, 1985), Reading (Revell and Glossop, 1989), Modena (Morreti, 1981), Androhep (Weitze, 1990).  
Nach Gadea (2003), modifiziert.

Sollten die Zellen während eines längeren Zeitraums untersucht bzw. konserviert werden, greift man zu so genannten Langzeitflüssigkonservierungsprotokollen. Diese sind für den Einsatz bis zu zehn Tagen geeignet; die Verwendung von Antibiotika ist dabei unumgänglich. Am häufigsten werden Aminoglykoside benutzt.

### **Inkubationsmedien für Kryo- und Niedrigtemperaturkonservierung**

Die unterschiedlichen Konservierungsmethoden (Kurzzeitflüssigkonservierung, Flüssigkonservierung bei Niedrigtemperaturen und Kryokonservierung) haben einen Einfluss auf den Stoffwechsel der *Spermatozoen*. Die Membraneigenschaften können durch Herabsetzung des Stoffwechsels sowie die Niedrigtemperaturlagerung beeinflusst werden (Buhr *et al.*, 1994; Chakrabarty *et al.*, 2007; Waterhouse *et al.*, 2006). Um unerwünschte Einflüsse auf die Membranen zu minimieren, werden schon seit langem bei der Niedrigtemperaturlagerung und Kryokonservierung der *Spermatozoen* milchprotein- und eidotterhaltige Medien zugegeben (Amidi *et al.*, 2010; Bathgate *et al.*, 2006; Farstad, 2009; Maldjian *et al.*, 2005; Trimeche *et al.*, 1997). Eidotter- sowie Milchproteinextrakte enthalten vor allem Fettsäuren und Lipoproteine; der Anteil an GPC beträgt mehr als 70% der gesamten Phospholipide (Cherian, 2008; Fuchs *et al.*, 2007; Yalcyn *et al.*, 2007). Somit könnten die Eidotterextrakte auch als proteingebundenes Fettsäure- und Lipidreservoir angesehen werden. Die molekularen Wechselwirkungen der mit den Lipoproteinen assoziierten Substanzen und den *Spermatozoen* sind noch nicht aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass durch die Supplementierung der porcinen Ejakulate mit eidotterhaltigen Medien, nach der Kryokonservierung bei den GPL und ihrer Fettsäurezusammensetzung eine signifikante Veränderung zu verzeichnen war (Buhr *et al.*, 1994). Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der diätären Supplementierung der Fettsäuren sowie lipidhaltigen Komponenten der Futtermittel und deren physiologischen Auswirkungen auf die *Spermatozoen*. Aus Platzgründen wird auf diese Thematik nicht näher eingegangen. Eine ausführliche Information ist (Castellano *et al.*, 2010; Mourvaki *et al.*, 2010; Strzezek *et al.*, 2004) zu entnehmen.

### **1.8 Bakterielle Kontamination der porcinen Ejakulate**

Die Spermatogenese im Hoden sowie der Reifungsprozess während der Nebenhodenpassage finden unter nahezu keimfreien Bedingungen statt (Schulze, 2010). Nach der Entnahme lassen sich in jedem Ejakulat Bakterien nachweisen. Faktoren, die die Keimzahl beeinflussen, sind die Methode der Entnahmetechnik, das Volumen der Präputialflüssigkeiten und die Gesundheit der Tiere. Das Präputialsekret des Ebers besteht aus Drüsensekreten, Epithelzellen, *Spermatozoen* und Harnresten. Dieses Sekret enthält eine grosse Anzahl von Keimen und ist für den Hauptteil der im Ejakulat gefundenen Bakterien verantwortlich (Schulze, 2010).

Wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, enthält jedes Medium eine Energiequelle (z.B. Glukose). So befinden sich 60 g Glukose in einem Liter Kiev-Medium, aber nur 2 g reichen für ein *E. coli*-Nährmedium aus. Gerade die gramnegativen Bakterien *E. coli*, *Salmonella* oder *Ps. aeruginosa* haben Temperaturoptimum bei der empfohlenen Lagertemperatur von 15–20°C (Okazaki *et al.*, 2010). Eine andere Temperatur der Konservierung ist ohne Kryoprotektiva nicht möglich, da die porcinen *Spermatozoen* sehr empfindlich auf niedrige Temperaturen reagieren (Rusu *et al.*, 2011). Da hygienische Maßnahmen allein nicht völlig ausreichend sind, um eine Keimfreiheit zu gewährleisten, wird heute eine Keimhemmung in flüssigkonservierten Ejakulaten durch Antibiotikazusatz gewährleistet (Althouse, 2008). So wurde bei der assistierten Reproduktion zunächst eine Kombination von Penicillin-Streptomycin benutzt. Nachdem vermehrt Resistenzen beobachtet wurden, wechselte man zu den Aminoglykosiden, v.a. Gentamycin, Neomycin oder Kanamycin. Selbst bei Zugabe dieser Antibiotika traten zwischenzeitlich Resistenzen auf. Deshalb wird in den letzten Jahren vermehrt mit neueren Antibiotika gearbeitet, auch mit solchen, die in der Humanmedizin als letzte Therapiereserve angesehen werden (Leiding, 2005). Da bei niedrigen Temperaturen das Generationsintervall der Bakterien zunimmt (Althouse *et al.*, 2008), könnte die Entwicklung eines zuverlässigen Flüssigkonservierungsverfahrens bei niedrigen Temperaturen zur Reduktion der Keimzahl führen.

### **2 PROBLEME, ZIELSTELLUNG UND STRATEGIE DER ARBEIT**

Die Anwendung der Niedrigtemperaturlagerung und der Kryokonservierung von *Spermatozoen* führt zu einer Reduktion der bakteriellen Kontamination und kann daher die Reduzierung von Antibiotikazusätzen ermöglichen. Da porcine *Spermatozoen* sehr kältesensitiv sind, werden seit Mitte des 20. Jahrhunderts bei diesen Konservierungsmethoden dem Medium lipidhaltige Proteinextrakte wie Eidotter und Milchproteine zugefügt. Die Lipid- und Fettsäurezusammensetzung der *Spermatozoen* sowie ihre Lipidbiosynthese sind unter diesen Bedingungen jedoch nur unzureichend erforscht. Die Untersuchung des Fettsäuremetabolismus und der Lipidbiosynthese ist daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dazu sollen zuerst die in porcinen *Spermatozoen* vorkommenden Lipide und Fettsäuren analysiert werden. Unter der Annahme, dass endogen vorkommende Fettsäuren auch als Substrate für die Lipidbiosynthese akzeptiert werden, soll die Metabolisierung verschiedener Monocarbonsäuren untersucht werden. Diese sollten dem Flüssigkonservierungsmedium zugegeben und so den *Spermatozoen* zur Verfügung gestellt. Bei dieser chemischen Supplementierung müssen sowohl die Bioverfügbarkeit (Löslichkeitsvermittlung) als auch die Zytotoxizität beachtet werden. Dazu werden zunächst alle notwendigen Komponenten mittels Zytotoxizitätsassay untersucht um die maximalen nicht toxischen Konzentrationen zu definieren. Radiochemische Experimente liefern Informationen über eine mögliche metabolische Aufnahme von Fettsäuren in bestimmte Lipidklassen der *Spermatozoen*. Die so charakterisierten Lipidklassen sollen dann nach Supplementierung mit stabilen Isotopen der entsprechenden Fettsäuren anhand massenspektrometrischer Methoden (CG, MALDI-TOF-MS, Q-TOF-MS) genauer analysiert werden. Für die eindeutige Zuordnung und Identifizierung der verschiedenen Lipidspezies sollte eine Lipid-Datenbank erstellt werden. Diese enthält die Massen aller theoretisch möglichen Quasimolekülen der betroffenen Lipidklassen. Der Einfluss von Temperatur und Inkubationsdauer auf die metabolische Aufnahme von Fettsäure in die entsprechenden Lipidklassen soll dann unter Berücksichtigung der Individuumspezifität anhand verschiedener Markierungs- und *Pulse-Chase*-Experimente untersucht werden. Anschließend werden die physiologischen Veränderungen der mit Fettsäuren bei Niedrigtemperatur supplementierten porcinen *Spermatozoen* charakterisiert (Motilität, Vitalität und Akrosomzustand). Dies sollte

## ZIELSTELLUNG

---

eine Aussage ermöglichen ob und welche Supplementierungsvarianten trotz Niedrigtemperaturlagerung zu einer Verbesserung des physiologischen Zustands der *Spermatozoen* führen. Da eine bakterielle Kontamination porciner Ejakulate trotz des Zusatzes von Antibiotika aufgrund von multiresistenten Stämmen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, muss auch die Möglichkeit der bakteriellen Verwertung von Fettsäuren untersucht werden, um Metabolisierungsprozesse gegebenenfalls genau zuordnen zu können.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle hier beschriebenen Experimente für die Überprüfung der Vergleichbarkeit und Genauigkeit mindestens dreimal wiederholt.

#### 3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

##### Chemikalien:

Die verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel, Detergenzien, Antibiotika und Zusätze wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) und Carl Roth (Karlsruhe) in der höchsten Reinheitsstufe bezogen. Die synthetischen und natürlichen Lipidstandards wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) geliefert. Organische Lösungsmitteln für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH in den dafür geeigneten Reinheitsgraden bezogen.

##### Radiochemikalien:

[1- <sup>14</sup> C]-Octadecadiensäure, Spezifische Aktivität: 55 mCi / mmol (203,5 MBq / mmol)	Hartmann Analytic GmbH
[U- <sup>13</sup> C]-Octadecadiensäure, <sup>13</sup> C <sub>18</sub> -99% der Atome, MW = 298.16	Campro Scientific GmbH

##### Geräte:

Szintillationszähler 1600 TR	Packard
Kieselgel-Platten 10 × 20 und 20 × 20 cm: SI <sub>250</sub> PA 7000-04, SI <sub>250</sub> PA 7003-04	J.T. Baker
Kieselgel 60 F <sub>254</sub> 10 × 10 und 20 × 20 cm:	Merk
Phosphorimager Analyser FLA3000	FujiFilm
Imageplatten-Eraser BAS-IPE 2040	FujiFilm
Imageplatte BAS-TR 2040	FujiFilm
Expositionskassetten BAS-Standard 2040	FujiFilm
Scankassette BAS-IP-Magazin 2040	FujiFilm
Tischzentrifuge Biofuge Fresco bzw. Stratos	Heraeus
Kühlzentrifuge 5810	Eppendorf
Heizplatte/Magnetrührer, Ikamag	IKA
MALDI-TOF, Autoflex I ( <i>matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometer</i> )	Bruker Daltonics
Q-TOF 6530 ( <i>quadrupole-time of flight mass spectrometer</i> )	Agilent
Gaschromatograph HP 6890 Plus GC	Agilent
UV-Transilluminator NU-72	Carl Roth
Vortexschüttler, VM-300	Gemmi, NeoLab

Heizplatte CT 1815	Carl Roth
Ultraschallbad Branson	B. Braun
Durchflusszytometer PAS	Partec
NucleoCounter SP-100	ChemoMetec
Waage, BP 211D	Sartorius
Thermoblock	Liebisch
Thermoblock DB2D	Techne AG
Sterilfiltereinheit (0,2 µm)	Nalgene, Rochester
Wasserbad, GFL 1002	GFL
Photometer Spekol 1200	Analytik Jena AG
Magnetrührer MAG MS10	Carl Roth
Rotationsschüttler Innova 4000	New Brunswick Sci.
Kontaminationsmonitor LB 122	Berthold Technologies
pH-Meter 511	Knick

### 3.2 Software

Analysensystem BAS 2000, software BAS Reader 3.01	FujiFilm
AIDA Bildanalysensoftware, Ver. 3.11 oder 4.27	Raytest
MassHunter Ver. 2.0.2	Agilent
Flex analysis, Ver. 2.2	Bruker Daltonics
FloMax Ver. 2.0	Partec
SPSS Statistics 19 Professional	IBM
StudySize 2.0	CreoStat HB
Microsoft Office 2010	Microsoft
Creative Suite 5	Adobe
Chemstation 4.0.2	Agilent

### 3.3 Statistische Auswertungen

Die Dateneingabe erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office 2010, Microsoft). Am Anfang der In-vitro-Untersuchungen wurde die erforderliche Stichprobengröße mittels Power-Analyse (*pairwise analysis*, StudySize 2.0) ermittelt. Die Auswertung der Daten und die Abbildungen wurden mit dem Programm SPSS Statistics 19 Professional (IBM) durchgeführt. Das Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) wurde auf 0,05 festgelegt. Die Power der Fallzahlplanung wurde auf 75% festgelegt. Es wurde angenommen, dass bei 90% der jeweils untersuchten physiologischen Kriterien ein Unterschied zu beobachten ist. Unter Verwendung statistischer Tests (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Friedman-Test) wurden verschiedene Hypothesen bezüglich signifikanter Unterschiede getestet. Als Nullhypothese wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als Alternativhypothese wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen.

Wenn im Friedman-Test  $p \leq 0,05$  ermittelt wurde, erfolgte *a posteriori* ein Post-Hoc-Test mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Testverfahrens und die Signifikanzen wurden hierbei mit der Bonferroni-Holm-Methode adjustiert. Wenn es nicht anders angegeben ist, wurde der „p-Wert“ stets zweiseitig und exakt berechnet angegeben. Die Ergebnisse sind als Boxplot-Diagramme mit dem höchsten bzw. niedrigsten gemessenen Wert (Whisker), dem Interquartilbereich zwischen dem 1. und 3. Quartil (Box) und dem Medianwert dargestellt (8.1.4).

### **3.4 Gewinnung, Flüssigkonservierung und Supplementierung von Spermatozoen**

Für die Untersuchung wurden sowohl native als auch in BTS-Medium (Tab. 3) ohne Antibiotikazusatz flüssigkonservierte Ejakulate des Hausschweins (*Sus scrofa domestica*; Rasse Piétrain, Duroc) von einer Besamungsstation zur Verfügung gestellt. Soweit nicht anders angegeben, wiesen sämtliche Ejakulate Motilitätswerte von mindestens 75% auf. Die Zellkonzentration der flüssigkonservierten Proben wurde auf  $2 \times 10^9$  motile Spermatozoen in 90 ml auf 34°C vorgewärmtem BTS-Medium eingestellt (3.5.1). Gleichzeitig erfolgte die Supplementierung der Zellen mit den in Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Substanzen (3.5.5, 3.9.1, 3.10). Die Zellen wurden bei 6°C (Niedrigtemperaturlagerung) bzw. 17°C (Flüssigkonservierung) gelagert.

### **3.5 Spermatologische Untersuchungen**

Vor jedem Versuch wurden die verwendeten Spermatozoen hinsichtlich ihrer Motilität und Morphologie beurteilt. Unter pathologischen Bedingungen können unreife Zellen (Spermatogonien) oder deformierte Spermatozoen (Kopf- oder Geißelteilung, abnorm großer Kopf) vorkommen. Als Mindestanforderung galten 75% motile und morphologisch intakte Spermatozoen am Anfang der Untersuchungen. Entsprechend die Probe nicht den oben genannten Kriterien, so wurde diese nicht für die Untersuchungen zugelassen bzw. von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

### 3.5.1 Zellzahlbestimmung

Die Erfassung der Zellzahl von nativen sowie flüssigkonservierten *Spermatozoen* wurde mittels NucleoCounter® SP-100™ (ChemoMetec A/S, Dänemark) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ausführlichere Erläuterungen zu Erfassung der Zellzahl von nativen sowie flüssigkonservierten *Spermatozoen* sind Hansen *et al.* (2006) zu entnehmen.

### 3.5.2 Plasmamembranintegrität und akrosomaler Status der Zellen

#### 3.5.2.1 Plasmamembranintegrität

Propidiumjodid (PI) wirkt als Nukleinsäureinterkalator und kann die perforierte Zellmembran von toten Zellen, aber in der Regel nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen. Daher ist es durch die Markierungen mit PI möglich, zwischen lebenden und toten *Spermatozoen* zu differenzieren (Garner *et al.*, 1986; Pintado *et al.*, 2000). Hierzu wurde PI mit einer Endkonzentration von 15 µM für 20 min bei 38°C zu den *Spermatozoen* ( $5 \times 10^6$ ) in ein lichtundurchlässiges Reaktionsgefäß gegeben. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die  $2 \times 10^5$  Zellen in die Messküvette mit 2 ml auf 38°C temperiertem, sterilfiltriertem *p*-NaCl-Medium gegeben. Die Messung erfolgte an einem Durchflusszytometer (PAS, Partec) mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 617 nm (FL-III Filter: LP>610 nm). Je Probe und Messung wurden insgesamt 15.000 Ereignisse erfasst. Die Auswertung erfolgte mit der Software FloMax, Ver. 2.0.

#### Phosphatgepufferte NaCl-Lösung (*p*-NaCl), pH 7,0:

- A) 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O
- B) 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O
- C) 16,1 ml Lösung A + 8,9 ml Lösung B werden mit *Aqua bidest.* auf 100 ml aufgefüllt (Phosphatpuffer)
- D) Phosphatpuffer wird mit 0,9% iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:3 verdünnt, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.
- E) Lösung wurde vor Gebrauch sterilfiltriert

Die *p*-NaCl-Lösung wurde von IFN-Schönow etabliert und dort in den Routineuntersuchungen angewandt. Die Herstellung erfolgte, wie oben beschrieben, ebenfalls durch IFN-Schönow. Da dieses Medium keine Energiequelle (z.B. Glukose,

siehe Kapitel 1.7) enthält, wurde dieses u.a. während den radiochemischen Untersuchungen (4.3.2) als ein Glukose-Mangel-Medium eingesetzt.

### 3.5.2.2 Akrosomaler Status

Die Ermittlung des Anteils an *Spermatozoen* mit Akrosomveränderungen wurde durchgeführt, um pathologische oder durch die jeweilige Behandlung der *Spermatozoen* hervorgerufene Veränderungen der akrosomalen Membranstruktur mikroskopisch zu erfassen. Die Fixierung der flüssigkonservierten Zellen erfolgte in 0,05% (v/v) Methylaldehyd (37%ige Formaldehydlösung, Merck). Aus der fixierten Probe wurden 4 µl auf einen Objektträger (ISO 8073, 76 × 26 mm) gegeben und mit einem Deckglas (DIN 58884, 18 × 18 mm) abgedeckt. Anschließend wurde bei 800-facher Vergrößerung die mikroskopische Beurteilung (Jenaval, Carl Zeiss) von 200 Zellen je Präparat hinsichtlich der nachfolgenden Kriterien durchgeführt:

- NAR** - normaler apikaler Rand
- GAR** - geschwollener apikaler Rand
- AIA** - Akrosom in Ablösung
- AA** - abgelöstes Akrosom
- DAR** - deformierter apikaler Rand

Akrosomdefekte [in %] =  $NAR - (GAR + AIA + AA + DAR)$

*Spermatozoen*, die nicht der Kategorie NAR entsprachen, wurden als akrosomdefekt bewertet und ihr Gesamtanteil in Prozent angegeben. Ausführlichere Erläuterungen zur Beurteilung der Akrosomveränderungen von nativen sowie flüssigkonservierten *Spermatozoen* sind Busch (2001) zu entnehmen.

### 3.5.3 Computerunterstützte Motilitätsanalyse (CASA) und Thermoresistenztest

Zur Beurteilung der Spermatozoenbewegung wurde das System SpermVision (SV)<sup>TM</sup> (Minitüb<sup>®</sup>, Tiefenbach) eingesetzt. Die Erfassung der zu messenden Parameter wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden die Proben durchmischt, eine aliquote Menge von 10 ml ( $2 \times 10^8$  Zellen) in ein Reagenzglas überführt und in einem Wasserbad bei 38°C unter Luftzutritt inkubiert. Für den Thermoresistenztest (TRT), welcher einen Vitalitätstest für flüssigkonservierte Zellen darstellt, wurden zwei Messzeitpunkte festgelegt. Eine erste Messung fand nach 30 min Inkubation statt, eine zweite 300 min nach Beginn der Inkubation. Dazu wurde nach dem Schwenken der Probe ein Aliquot von 2,5 µl ( $5 \times 10^4$  Zellen)

entnommen und in eine Messkammer des Typs Leja-4™ (Leja®, Nieuw-Venep) überführt, die zuvor ebenfalls auf 38°C erwärmt worden war (Heizplatte HAT 200, Minitüb®, Tiefenbach).

Die Messung erfolgte etwa 15 Sekunden nach vollständiger Verteilung der Probe in der Kammer entlang der Kammermittellinie. Es wurden vor allem die lokale und die progressive Motilität sowie der Anteil immotiler Spermien erfasst. Je untersuchte Probe wurden 1000 *Spermatozoen* bzw. 15 Messfelder ausgewertet. Der Mittelwert aller Motilitätsdaten der einzelnen Gesichtsfelder stellte das Ergebnis einer Messung dar (Schulze, 2010). Als Gesamtmotilität werden alle beweglichen *Spermatozoen* zusammengefasst. Ausführlichere Erläuterungen zu den Parametern nach CASA sind Boyers (1989) zu entnehmen.

### **3.5.4 Bestimmung der Mitochondrienaktivität und Spermatozoenvitalität**

In Anlehnung an flowzytometrische Untersuchungen von Human- (Wu *et al.*, 2006), Bullen- und Hengstspermatozoen (Graham *et al.*, 1990; Papaioannou *et al.*, 1997) erfolgte die Analyse der Spermatozoenvitalität und Mitochondrienaktivität mittels Durchflusszytometrie anhand einer Rhodamin 123 (Rh123) / Propidiumiodid (PI)-Färbung. Das Membranpotential der inneren mitochondrialen Membran (MMP) wurde semiquantitativ mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Rh123 gemessen (Baracca *et al.*, 2003). Voraussetzung für die Signaldetektion sind lebende Zellen mit funktionsfähigen Mitochondrien, die eine negativ geladene Mitochondrienmatrix (MM) aufweisen (Ericsson *et al.*, 1993; Garner *et al.*, 1986; Garner *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1993). Aufgrund der positiven Ladung von Rh123 lagern sie sich selektiv in Abhängigkeit vom negativen MMP in die mitochondriale Matrix ein. Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Höhe des MMPs. Über die Höhe des MMPs sagt diese Methode nichts aus. Sie ermöglicht nur die Visualisierung von funktionsfähigen Mitochondrien. Hierzu wurde Rh123 zu den *Spermatozoen* ( $5 \times 10^6$ ) mit einer Endkonzentration von 0,52 µM für 20 min bei 38°C in ein lichtundurchlässiges Reaktionsgefäß gegeben. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die  $2 \times 10^5$  Zellen in eine Messküvette mit 2 ml auf 38 °C temperiertem, sterilfiltriertem *p*-NaCl-Medium gegeben. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer (PAS, Partec GmbH, Münster) mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm (FL-I Filter: BP 500-560 nm). Die Behandlung mit PI wurde bereits in 3.5.2.1 beschrieben. Je Probe und

Messung wurden insgesamt 15.000 Ereignisse erfasst. Die Auswertung erfolgte mit der Software FloMax Ver. 2.0. Die Ergebnisse einer Messung werden in Form von Dotplots sowie 1-Parameter-Histogrammen dargestellt. Die Software beinhaltet eine Regionenstatistik, woraus der prozentuale Anteil Rh123-markierter Zellen sowie die Intensität der Fluoreszenz erkennbar ist.

### **3.5.5 Zytotoxizitätsassay**

Zur Feststellung in welchen Konzentrationen und unter welchen Bedingungen die freien Fettsäuren sowie andere Komponenten des Inkubationsmediums für die Supplementierung der *Spermatozoen* einzusetzen sind, musste die zytotoxische Wirkung der einzelnen Komponenten des Mediums untersucht werden.

#### **3.5.5.1 Inkubation mit Ethanol**

Für die Überprüfung der zytotoxischen Wirkung von Ethanol wurden  $2 \times 10^9$  den Mindestkriterien (3.4) entsprechenden *Spermatozoen* in 90 ml BTS-Medium mit 19  $\mu$ M, 190  $\mu$ M, 1.9 mM, 19 mM Ethanol (E-7023, Sigma) versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 6 Stunden bei RT. Danach wurden *Spermatozoen* hinsichtlich ihrer Motilität (3.5.3) und Akrosommorphologie (3.5.2.2) beurteilt. Entsprechend der Probe zu diesem Zeitpunkt den Mindestkriterien, so wurde eine Nachinkubation für 24 Stunden bei 17°C mit anschließenden Nachuntersuchungen durchgeführt.

#### **3.5.5.2 Inkubation mit fettsäurefreiem Rinderserumalbumin**

Analog zur Inkubation mit Ethanol wurde eine Inkubation mit BSA durchgeführt. Das Protein wurde in *p-NaCl* aufgenommen und den Zellen mit 1.7  $\mu$ M, 17  $\mu$ M, 85  $\mu$ M, 170  $\mu$ M BSA zugegeben. Umfang und Inkubationsbedingungen der Untersuchungen entsprachen dem Zytotoxizitätsassay für Ethanol (3.5.5.1).

#### **3.5.5.3 Inkubation mit freien Fettsäuren**

Analog zur Inkubation mit Ethanol wurde eine Inkubation mit freien Fettsäuren (40  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 800  $\mu$ M) durchgeführt. Da die Fettsäuren durch ihre lipophilen Eigenschaften gekennzeichnet sind, konnte auf den Einsatz von Löslichkeitsvermittlern nicht verzichtet werden. Hierzu wurden die Octadecadiensäure in zytotoxisch unbedenklichen Mengen von Ethanol (190  $\mu$ M bis 1.9 mM) aufgenommen (4.3.1.1) und in den oben genannten Konzentrationen den

Zellen zugegeben. Der Umfang der Untersuchungen, sowie die Inkubationsbedingungen entsprachen dem Zytotoxizitätsassay für Ethanol (3.5.5.1).

### **3.6 Lipidanalytik**

#### **3.6.1 Gesamtlipidextraktion**

Für die Lipidextraktion wurden *Spermatozoen*, Bakterien sowie Seminalplasma der Fragestellung entsprechend aus frischem, eingefrorenem oder kochlysiertem Material verwendet. Der Waschvorgang der Zellen vor der Lipidextraktion wurde mindestens zweimal wiederholt. Dafür wurden die Zellen 10 min bei 800 g (*Spermatozoen*) bzw. 3000 g (Bakteriensuspension) zentrifugiert, der Überstand wurde in gleichem Volumen des frischen Mediums aufgenommen und durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Die Inaktivierung der Lipasen erfolgte durch die Kochlyse bzw. die Zugabe von organischen Lösungsmitteln. Die Extraktion der Lipide erfolgte mittels Zweiphasenextraktion nach Bligh and Dyer (1959). Die Lipide wurden entweder in Chloroform / Methanol (2:1) aufgenommen und die einzelnen Lipidkomponenten über Dünnschichtchromatographie (DC) präparativ aufgereinigt oder bei -20°C gelagert.

##### **3.6.1.1 Lipidextraktion aus *Spermatozoen* und aus Bakterien**

Die sedimentierten Zellen wurden in einer ersten Extraktion mit Chloroform / Methanol (1:2) mindestens 30 min bei RT geschüttelt. Die Trennung von Zellen und Lösungsmittel erfolgte jeweils durch Zentrifugation (10000 g, 10 min, 4°C). Die zweite Extraktion erfolgte mit Chloroform / Methanol (2:1) unter den gleichen Bedingungen wie die erste Extraktion. Nach Vereinigung der beiden Extrakte wurde der Gesamtextrakt entweder direkt auf ein Verhältnis Chloroform / Methanol / (0,45%) NaCl in H<sub>2</sub>O (2:1:0,75) eingestellt oder bei größeren Mengen zuvor unter Stickstoff oder Argon eingeeengt und dann im angegebenen Lösungsmittelgemisch wieder aufgenommen (Hölzl, 2005). Durch Zentrifugation (1000 g, 5 min, 4°C) wurde eine optimale Phasentrennung erreicht.

##### **3.6.1.2 Lipidextraktion aus Seminalplasma**

Die Lipidextraktion aus dem Seminalplasma (natives Ejakulat) erfolgte wie in 3.6.1.1 beschrieben, wobei das Extraktionsmittel im Überschuss vorlag (Folch *et al.*, 1957). Das Verhältnis Extraktionsmittel / Seminalplasma wurde für die Extraktionen bei

mindestens 5:1 eingestellt. Nach Vereinigung der beiden Extrakte wurde der Gesamtextrakt auf ein Verhältnis Chloroform / Methanol / (0,45%) NaCl in H<sub>2</sub>O (2:1:0,75) eingestellt. Die organische Phase wurde abgenommen, eingeeengt und in Chloroform / Methanol (2:1) aufgenommen.

### 3.6.1.3 Lipidextraktion aus Kieselgel

Nach der Behandlung mit Primulinreagenz (Tab. 3) wurde der zu untersuchende Bereich der DC-Plate im UV-Licht visualisiert und mit einem Bleistift markiert. Die so markierten Kieselgelbereiche wurden von der DC-Plate abgenommen und die Lipide aus dem Kieselgel, wie unter Punkt 3.6.1.1 beschrieben, isoliert.

**Tabelle 3: Reagenzien für den Nachweis von bestimmten Lipidklassen auf DC-Platten**

Reagenz	Destruktivität	Lipidklass*
<b>Primulin</b> 0.005% (w/v) Primulin in Aceton / H <sub>2</sub> O (80:20, v/v)	nein	alle
<b>Ninhydrin</b> 0.25% (w/v) Ninhydrin in Aceton	ja	GPS, GPE
<b>Molybdenum Blue Spray Reagent</b> , 1.3% (Sigma-Aldrich)	ja	PL
<b>Iod</b>	ja	alle
<b>α-Naphthol</b> 2,67% w/v Naphthol in Lösungsmittel: 83,3% v/v Methanol 6,7% v/v H <sub>2</sub> O 10% v/v H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ja	Glycolipide

\*) PL: alle Phospholipide, GPS: Glycerophososerin, GPE:Glycerophoshoethanolamin

### 3.6.2 Trennung, Visualisierung und Identifizierung einzelner Lipidklassen mittels Dünnschichtchromatographie

Die Lipidextrakte (3.6.1) wurden zur Trennung in ihre Einzelkomponenten auf Kieselgelplatten (Merck oder J.T. Baker), mit oder ohne eine Konzentrierungszone, in einer Bandbreite je nach Lipidmenge / Fragestellung – mit Glaskapillaren in maximal bis 1,0 cm langen Streifen aufgetragen. Die DC-Platten wurden in eine mit dem Laufmittel (Tab. 4) gesättigte DC-Kammer gestellt. Nach der Auftrennung (Laufmittel ca. 1 cm unter dem oberen Rand der DC-Platte) wurde die Platte herausgenommen und an der Luft (bei den destruktiven Analysen) bzw. unter Stickstoff oder Argon (für weitere massenspektrometrische Untersuchungen) getrocknet.

**Tabelle 4: Laufmittel für die chromatographische Auftrennung von Lipidgemischen.**

Laufmittelgemisch	Verhältnis (v:v)	Referenz
Chloroform / Methanol / H <sub>2</sub> O	65:25:4	(Hawrot and Kennedy, 1975)
Aceton / Toluol / H <sub>2</sub> O *	91:30:8	(Dörmann <i>et al.</i> , 1995)
<i>n</i> -Hexan / Diethylether / Eisessig	85:15:1	(Pie and Giner, 1966)
Chloroform / Methanol / 25% NH <sub>4</sub> OH	90:54:7	(Weingartner <i>et al.</i> , 2010)
Chloroform / Methanol / Aceton / Eisessig / H <sub>2</sub> O bei 30°C	50:10:20:10:5	(Weingartner <i>et al.</i> , 2010)

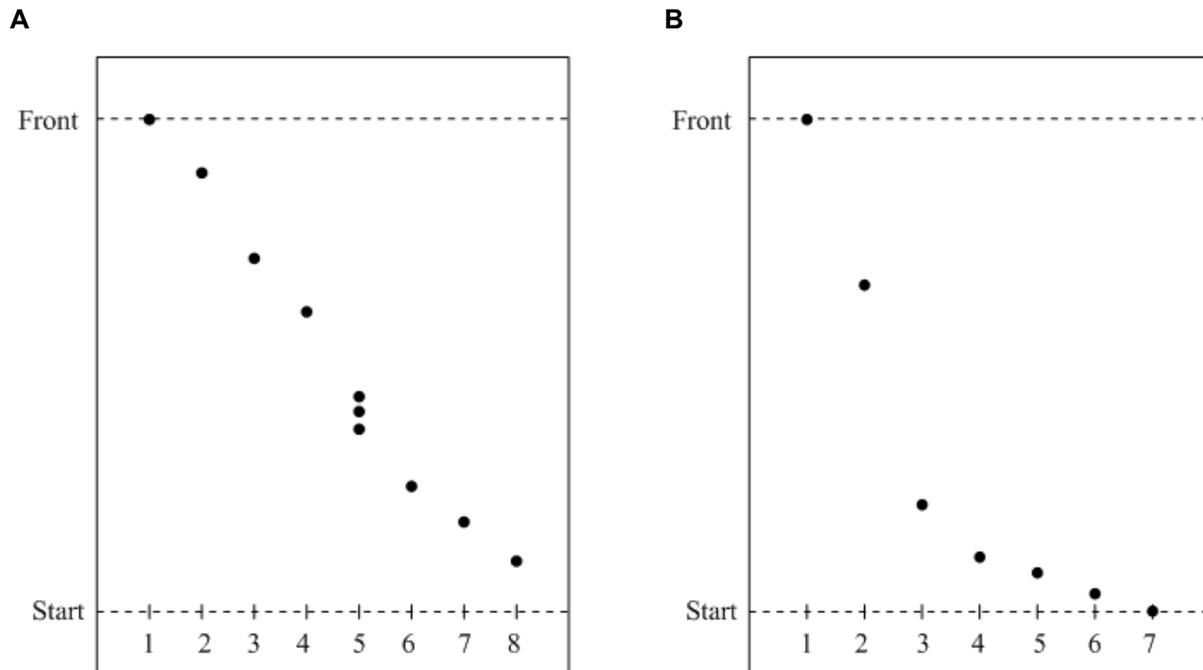
\*) DC-Platten wurden kurz in 0,15 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getaucht und mindestens zwei Tage getrocknet, vor dem Einsatz 2,5 Stunden bei 120°C aktiviert.

Mit Hilfe von Referenzsubstanzen, basierend auf Farbreaktionen und Wanderungsgeschwindigkeit ( $R_f$ -Wert), erfolgte dann die Zuordnung der separierten Lipidbanden. Die Identifizierung und Strukturanalysen präparativ gereinigter Lipide erfolgten mittels massenspektrometrischer Techniken (3.7). Um die Lipide auf den entwickelten Kieselgelplatten zu detektieren, wurden die Platten durch Besprühen mit verschiedenen Reagenzien selektiv gefärbt (3.6.1.3).

### **3.6.3 Ermittlung der Trenneigenschaften des Lipidgesamtextraktes porciner Spermatozoen in der dünnschichtchromatographischen Auftrennung**

#### **3.6.3.1 Eindimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung**

Eine effektive dünnschichtchromatographische (DC) Zuordnung zu einer bestimmten Lipidklasse ist nur dann möglich, wenn die Laufeigenschaften der einzelnen Lipidfraktionen unterschiedlich sind. Dies wurde anhand unterschiedlicher Laufbedingungen erreicht (3.6.2). Eine Verifizierung wurde anhand der massenspektrometrischen Analysen (3.7) durchgeführt. Ein Beispiel für die ermittelten DC-Laufmuster von neutralen und polaren Lipiden der porcinen Spermatozoen ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: 1D-dünnschichtchromatographische Auftrennung einer Lipidfraktion von porcinen Spermatozoen. Eine schematische Darstellung.**

**A.** polare Lipidfraktion:

1. neutrale Lipide 2. freie Fettsäuren 3. Glycerophosphoethanolamin 4. Sulfogalactosylglycerolipid  
5. Glycerophosphocholin 6. Glycerophosphoserin 7. Glycerophosphoinositol 8. Sphingolipid  
Laufmittel: Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O (65:25:4), DC-Platten: SI<sub>250</sub> PA 7003-04, J.T. Baker.

**B.** neutrale Lipidfraktion:

1. Wachsalkohole 2. Triacylglycerol 3. freie Fettsäuren 4. 1,3-Diacylglycerol 5. 1,2-Diacylglycerol  
6. Monoacylglycerol 7. polare Lipide  
Laufmittel: *n*-Hexan / Diethylether / Eisessig (80:15:1), DC-Platten: SI<sub>250</sub> PA 7003-04, J.T. Baker.

### 3.6.3.2 Zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung

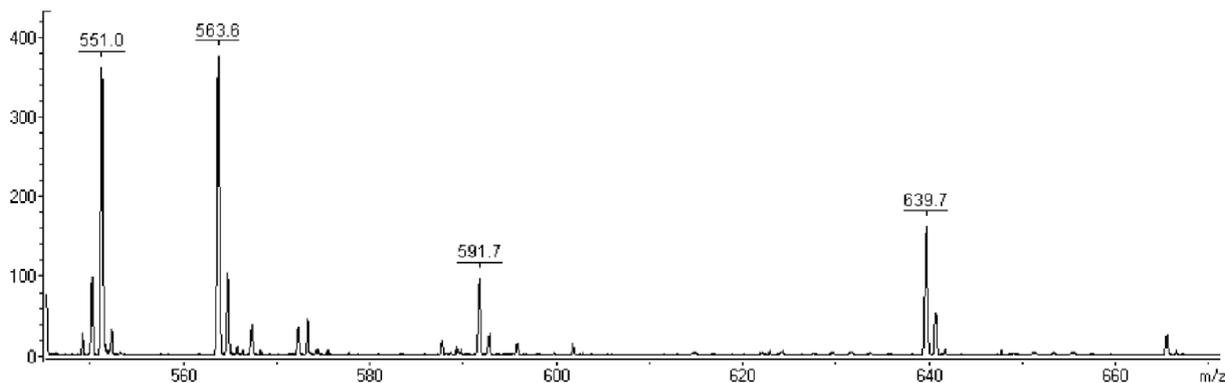
Die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (2D-DC) wurde genutzt, um die einzelne polare Lipidklassen eindeutig voneinander zu trennen. Bei der 2D-DC wurden DC-Platten SI<sub>250</sub> PA 7003 (J.T. Baker) ohne Konzentrationszone verwendet. Der Lipidextrakt wurde an der unteren Ecke der Platte aufgetragen. Zuerst lief die Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Chloroform / Methanol / 25% NH<sub>4</sub>OH (90:54:7). Nach Beendigung der ersten chromatographischen Auftrennung wurde die dünnschichtchromatographische Platte vollständig getrocknet und um 90° gedreht und der zweiten Chromatographie im Laufmittel Chloroform / Methanol / Aceton / Eisessig / H<sub>2</sub>O (50:10:20:10:5) bei 30°C unterzogen (Weingartner et al., 2010).

### 3.7 *Massenspektrometrie*

#### 3.7.1 **Matrix unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)**

Die MALDI-TOF-Untersuchungen wurden an einem Massenspektrometer Autoflex I (Bruker Daltonics) durchgeführt. Zur Analyse lagen die Proben (zu untersuchende Substanzen 10 µM – 0,01 µM) in verschiedenen Lösungsmittelgemischen vor, in der Regel in Chloroform oder Chloroform / Methanol (2:1, v/v). Zur Präparation von Proben wurde in dieser Arbeit die „*Dried Droplet*“-Methode verwendet. Es wurden je 1 µl der Lipidextraktprobe (vorliegend in 0,1% TFA) mit 2 µl Matrix auf einem MALDI-Probenträger (MTP 384 *massive target gold plated*, Bruker Daltonics) gemischt. Als Matrix diente entweder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder 9-Aminoacridin (9-AA), die sich beide in ihren sauren bzw. basischen Eigenschaften unterscheiden. Nach der zügigen Auskristallisierung der Analyt-Matrix-Mischung auf dem Probenträger wurden die Proben in der Probenkammer des Massenspektrometers mit einem Stickstofflaser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) und positiver / negativer Ionendetektion im Reflektronmodus analysiert. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV, die Detektorempfindlichkeit wurde nach Bedarf eingestellt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Flex analysis, Version 2.2 (Bruker Daltonics).

Die Identifizierung der einzelnen Lipide erfolgte anhand ihrer exakten Massen. Verschiedene Lipid-Spezies weisen die gleiche Summenformel auf und haben daher exakt die gleichen Massen. Bei den Messungen im positiven Ionenmodus fand die Desorption der Moleküle erst nach einer präparativen Aufreinigung der einzelnen Lipidfraktionen (3.6.1.3) bzw. direkt von DC-Platten statt (Fuchs *et al.*, 2007), um eine Verwechslung der Lipidspezies ausschließen zu können. Handelte es sich um ein aus der gleichen Lipidklasse bestehendes Gemisch, so wurden als alternative Bestimmungsmethode anhand Q-TOF-massenspektrometrischer Techniken (3.7.2) durchgeführt, und die Bildung charakteristischer Fragmente für die jeweiligen Fettsäuren / Fettaldehyde bei der Identifikation mit einbezogen (3.7.2).



**Abbildung 9: MALDI-TOF-Massenspektrum von einem Gemisch präparativ gereinigter neutraler Lipide, positive Ionendetektion.**

Der vergrößerte Ausschnitt des Massenspektrums zeigt die detektierten Molekülionen von:

1. DAG-32:0  $[M+Na]^+$   $m/z=591,7$  (DAG-16:0 / 16:0, -12:0 / 20:0, -14:0 / 18:0)
2. DAG-36:4  $[M+Na]^+$   $m/z=639,7$  (DAG-18:2 / 18:2, -12:0 / 24:4, -16:0 / 20:4, -18:1 / 18:3)

MALDI-TOF-MS-Bedingungen s. 3.7.1

Das MALDI-TOF-Massenspektrum präparativ gereinigten neutralen Lipiden (Abb. 9) zeigt u.a. zwei  $[M+Na]^+$ -Produktpeaks  $m/z = 591,7$  und  $m/z = 639,7$ . Diese könnten jedoch unterschiedliche Molekülionen aufweisen. Das erste Molekülion mit  $m/z = 591,7$  könnte zu den DAG-16:0 / 16:0, -12:0 / 20:0 oder -14:0 / 18:0 zugeordnet werden. Alle drei Substanzen weisen gleiche elementare Zusammensetzung ( $C_{35}H_{68}O_5$ ) und daher exakt die gleichen Massen auf. Das zweite Molekülion  $m/z = 639,7$  könnte entsprechend dem DAG 18:2 / 18:2, 12:0 / 24:4, 16:0 / 20:4 sowie 18:1 / 18:3 zuzuordnen werden. Alle vier Substanzen weisen die gleiche Summenformel  $C_{39}H_{68}O_5$  auf. Da bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie eine Identifizierung der exakten Massen der jeweiligen Fettsäure ohne Fragmentierungsanalysen nicht möglich ist, wird in dieser Arbeit die Bruttofettsäurekomposition angegeben. So stellt beispielweise 36:4 eine Gesamtzahl von 36 C-Atomen in den Fettsäureketten sowie vier Doppelbindungen dar.

### 3.7.2 Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (Q-TOF-MS)

Die Q-TOF-MS-Untersuchungen wurden mit einem Massenspektrometer (Q-TOF, 6530; Agilent) durchgeführt. Zur Analyse lagen die Proben entweder präparativ gereinigt über Dünnschichtchromatographie oder als Gesamtextrakte vor. Die Lipide wurden in einer Chloroform / Methanol / 300 mM  $NH_4OAc$  (300:665:35) aufgenommen und im Massenspektrometer mit Hilfe einer Chip-basierten Nanospray-Ionenquelle (HPLC Chip / MS 1200 *infusion chip*; Agilent) injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 1 bis 2  $\mu l \times min^{-1}$ . Die Proben wurden in positiver Ionendetektionmode mit einer Fragmentor-Spannung von 200 V analysiert. Die

Molekülionen wurden im Quadrupole selektioniert und in der Kollisionszelle in Stickstoff mit einer Kollisionsenergie von 30 V (GPC, Ether-GPC) bzw. 20 V (DRG) fragmentiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Mass Hunter Workstation Software, Version B.02.00 (Agilent).

### **3.7.2.1 Auswertung der Spektren und Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen**

Kommerzielle Datenbanken zur Lipidanalytik der *Spermatozoen* sind *bis dato* nicht verfügbar. Durch eine große Anzahl hintereinander aufgenommener Massenspektren bei einem Q-TOF Lauf werden enorm große Datenmengen generiert. Eine manuelle Berechnung der genauen Massen der Lipidspezies und der anschließende Vergleich mit den detektierten Massen unterschiedlicher Molekülionen (bzw. putativen Ionfragmenten) sind zeitaufwendig und wenig effizient. Daher wurden in dieser Arbeit alle Lipidklassen, die durch radiochemische Untersuchungen (3.9.5) identifiziert wurden, alle theoretisch vorkommenden Möglichkeiten von Lipidspezies der porcinen *Spermatozoen*, sowie die Lipidspezies, die sich von den supplementierten stabilen Isotopen (3.10) ableiten, in einer Datenbank zusammengefasst (8.1.1). Diese enthält Summenformel, Exakte- und Nominalmasse, Fettsäurereste sowie Massen von möglichen Ionisationsprodukten und umfasst alle putativen Glycerophosphocholine (GPC), Diradiylglycerole (DRG), Monoradiylglycerole (MRG) inklusive deren *plasmanyl-* und *plasmenyl-* Formen. Die Identifizierung der einzelnen Lipide erfolgte anhand ihrer exakten Massen und dem anschließenden Vergleich mit den detektierten Massen. Um eine Verwechslung unterschiedlicher Moleküle mit exakt gleichen Massen ausschließen zu können, wurden Fragmentierungsanalysen durchgeführt und anhand charakteristischer Fragmente Lipidspezies identifiziert.

## **3.8 Fettsäurequantifizierung mittels Gaschromatographie**

Die Fettsäurequantifizierung basiert auf der Methylierung von Fettsäuren (Browse *et al.*, 1986) und ihrer Auftrennung über Gaschromatographie (GC). Es handelt sich um säurekatalysierter Transmethylierung der Fettsäuren wobei die Fettsäuremethylester (FAME) gebildet werden. Diese werden anschließend mittels GC bestimmt. Etwa 50% der Spermatozoenlipide sind Ether-Glycerophospholipide. Ether-GPL sind durch einfache Etherbindung oder eine Enoetherbindung an der C-1-Position des Glycerols gekennzeichnet. Der Fettsäurerest an den C-2-Positionen des Glycerols ist

über eine Esterbindung verknüpft. Durch die FAME-Reaktion lassen sich ausschließlich die Esterbindungen spalten. Ethergebundene Alkanen und Alkenen werden anhand Fragmentierungsanalysen quantifiziert (3.7.2).

### 3.8.1 Transmethylierung von Fettsäuren

Zur Analyse der Fettsäurezusammensetzung wurden die zu untersuchenden Proben mit methanolischer 1 N HCl und 5 µg Fettsäure-15:0 als internem Standard versetzt. Die Inkubation (30 min bei 80°C) erfolgte in Glasgefäßen mit Schraubdeckel mit einem teflonbeschichteten Septum (Reagenzglas: # 233 175 11 59, Schraubdeckel: # 29 240 08 06, Septum: # 29 248 08 05). Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 1 ml Hexan und 1 ml 0,9% NaCl-Lösung versetzt, geschüttelt und abzentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen, eingengt, in 100-150 µl Hexan aufgenommen und anschließend in GC-Autoinjektionsröhrchen (Chromacol, Abimed Analysetechnik, Langenfeld) überführt.

### 3.8.2 Gaschromatographische Auftrennung von Fettsäuren

#### 3.8.2.1 Gaschromatographie

Die Auftrennung erfolgte mittels eines GC (HP 6890 Plus GC, Agilent) mit einer Kapillarsäule Supelco SP-2380 (Länge: 30 m, Durchmesser: 750 µm, Schichtdicke: 0,2 µm), Das Injektionsvolumen betrug 2 µl bei 220°C. Die Detektion erfolgte mit Flammenionisationsdetektor (FID) bei 250°C. Die Flussrate des Trägergases (Helium) betrug 11 ml / min. Die Temperaturgradienten betragen: 1 min – 100°C, in 2,4 min auf 160°C, in 6 min auf 220°C, 4 min – 220°C (konst.), in 5 min auf 100°C. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen Chemstation 4.0.2 (Agilent) und Excel (Microsoft).

Bei diesen Untersuchungen wurden die Fettsäuren (FS) mit einer Kettenlänge von 12C bis zu 22C Atome berücksichtigt. Da tierische Fettsäuren u.a. durch das Vorkommen von langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (VL-PUFA) sowie von Fettsäuren mit funktionellen Gruppen (z.B. methylsubstituierten Fettsäuren) charakterisiert sind, und diese ihrerseits nahezu identische Retentionszeiten mit VL-PUFA aufweisen, kann bei den GC-Analysen eine fälschliche Zuordnung von Fettsäuren mit funktionellen Gruppen zu VL-PUFA nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden (Glass *et al.*, 1974; Kluytmans and Zandee, 1973). Dies ist jedoch nur anhand der Referenzsubstanzen, z.B. VL-PUFA oder methylsubstituierten

Fettsäuren oder nicht-methylsubstituierten Produkten der Oxidation von Fettsäuren möglich. Da solche Referenzsubstanzen im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen waren, wurde auf eine gaschromatographische Analyse von VL-PUFA verzichtet. Die langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Poulos *et al.*, 1986) sind laut Literaturangaben mit bis zu 30 mol% in den Glycerophospholipiden porciner *Spermatozoen* vertreten (Am-In *et al.*, 2011; Waterhouse *et al.*, 2006). Daher wurde bei der Auswertung der GC-FID-Daten der Anteil von VL-PUFA für alle Lipidklassen pauschal mit 30 mol% angenommen. Die gekoppelte gaschromatographische Massenspektrometrie (GC-MS) wurde als weitere Möglichkeit zur Analyse verwendet.

### **3.8.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

Die Auftrennung erfolgte mittels HP 6890 Plus GC, 5973 *Inert Mass Selective Detector*, Elektronenstoßionisation (Agilent) mit einer Kapillarsäule Hewlett-Packard 5MS-Säule (Länge: 30 m, Durchmesser: 0.25 mm, Schichtdicke: 0.2 µm). Die Temperaturgradienten betragen: 2 min – 140°C, in 4 min auf 250°C (10°C / min), in 6 min auf 220°C, in 20 min auf 140°C (20°C / min). Die Detektion erfolgte anhand des Totalionenstroms (TIC) und die Auswertung mit den Programmen Chemstation 4.0.2 (Agilent) und Excel (Microsoft).

## **3.9 Radiochemische Untersuchungen**

Eine Möglichkeit der Verwertung von Octadecadiensäure durch die porcinen *Spermatozoen* ist in der Fachliteratur nicht beschrieben und der Einbau in die Lipide der Zellen nicht auszuschließen. Anhand der Markierungsexperimente mit radioaktiven Isotopen können jedoch Einblicke in den Metabolismus der Fettsäure gewonnen werden.

### **3.9.1 Markierungen der Spermatozoen mit [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure**

Zu metabolischen Studien wurden die  $2 \times 10^8$  bis  $1 \times 10^9$  *Spermatozoen* im BTS-Medium mit dem Isotopengemisch der Octadecadiensäure für bestimmten Zeiten und bei einer bestimmten Temperatur markiert. Die genaueren eingesetzten Isotopmengen, die Dauer der Markierung sowie die Inkubationstemperatur sind zu dem jeweiligen Experiment im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt (4.3).

Die Endkonzentration der Octadecadiensäure betrug 39  $\mu\text{M}$ , wobei der Anteil von [ $^{12}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure auf 30 – 35  $\mu\text{M}$  und [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure auf 4-9  $\mu\text{M}$  eingestellt wurde. Die Zugabe des Isotops erfolgte in 100× Mastermix in 1% *p*-NaCl (v/v) jeweils zu Beginn der Markierungszeit.

### Die Muster-Berechnung der Aktivitätskonzentration zu metabolischen Studien:

Isotopengemisch:

90% [ $^{12}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure und 10% [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure

Spezifische Aktivität der [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure:

55 mCi / mmol (203,5 MBq / mmol).

Zellzahl:

$1 \times 10^9$  *Spermatozoen* in 45 ml BTS, 39  $\mu\text{M}$  Octadecadiensäure sowie 17  $\mu\text{M}$  BSA.

Eingesetzte Menge von FS (490  $\mu\text{g}$ ):

441  $\mu\text{g}$  (30  $\mu\text{M}$ )  $^{12}\text{C}$ -Isotop und 49  $\mu\text{g}$  (9  $\mu\text{M}$ ) [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Isotop in 450  $\mu\text{l}$  von *p*-NaCl

Das entspricht 9,57  $\mu\text{Ci}$ .

Die Reaktion wurde entweder durch die „Kochlyse“ (s. „*Puls-Chase*“, 3.9.6) oder durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln gestoppt. Dadurch wurden die Enzyme der *Spermatozoen* inaktiviert. Anhand der Vorarbeiten konnten keine Unterschiede zwischen kochlysierten- und durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln behandelten Proben festgestellt werden.

### **3.9.2 Markierungen des Seminalplasmas mit [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure**

Zu den Seminalplasma-Markierungsexperimenten wurde 1 ml bis 2 ml des nativen Ejakulates eingesetzt. Die eingesetzte Menge des Isotopgemisches (3.9.1) betrug 0,5-1  $\mu\text{Ci}$  / ml Seminalplasma. Gleichzeitig fand die Markierung derselben flüssigkonservierten Probe statt. Ein Vergleich von Markierungsvarianten könnte die Hinweise über seminalplasmaspezifischen Signale liefern.

### **3.9.3 Markierungen der bakteriellen Kulturen**

Bei den Markierungsexperimenten der *Spermatozoen* kann eine bakterielle Verwertung nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurden bakterielle Flüssigkulturen des jeweils zu untersuchenden Ejakulates im BTS-Medium (nach einer Anwachsphase: 0,5 bis  $1 \times 10^9$  Zellen / ml) mit 0,1 - 1  $\mu\text{Ci}$  markiert. Die

Experimentbedingungen wurden sowohl für *Spermatozoen* als auch für die bakteriellen Flüssigkulturen gleich gehalten. Die genaueren eingesetzten Isotopmengen, die Dauer der Markierung sowie das Temperaturregime sind zu dem jeweiligen Experiment im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt (4.1.1).

### **3.9.4 Visualisierung radioaktiv markierter Verbindungen**

Zur Detektion und Quantifizierung [ $^{14}\text{C}$ ]-markierter Lipide nach der DC-Auftrennung (3.6.2) wurden die nach dem Lauf getrockneten DC-Platten in einer Expositionskassette (BAS-Standard 2040, FujiFilm) zusammen mit einer Imageplatte (BAS-TR 2040, FujiFilm) fixiert. Die Kassette wurde je nach eingesetzter Menge des Isotops von 12 bis zu 72 Stunden bei RT exponiert und anschließend mit dem Phosphorimager Analyser (FLA3000; Scankassette, BAS-IP-Magazin 2040, FujiFilm) analysiert. Zur densitometrischen Quantifizierung der Signale wurde die AIDA Software (Raytest) verwendet (Binder and Archimbaud, 2000).

### **3.9.5 Identifizierung radioaktiv-markierter Verbindungen**

Die nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung getrocknete Platten wurden der densitometrischen Quantifizierung der Signale unterzogen. Mit Hilfe von Referenzsubstanzen, basierend auf Farbreaktionen und Wanderungsgeschwindigkeit ( $R_f$ -Werten), erfolgte die Zuordnung zu der jeweiligen Lipidklasse (3.6.3). Durch das „overlay“-Bild der visualisierten DC-Platte mit dem entsprechenden Radiosignal erfolgte eine Zuordnung der jeweils betroffenen Lipidklassen. Eine Verifizierung der so erzielten Ergebnisse wurde anhand der massenspektrometrischen Untersuchungen mit stabilen Isotopen durchgeführt (3.10).

### **3.9.6 Puls-Chase-Markierungen mit [1- $^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure**

Bei Puls-Experimenten wurde eine Aktivität von 0,5 bis 2  $\mu\text{Ci}$  / 30 ml BTS-Medium mit  $0,66 \times 10^9$  *Spermatozoen* wie bereits im 3.9.1 beschrieben, eingesetzt. Hier wurde die Aktivität nicht herabgesetzt. Aufgrund der ermittelten toxischen Wirkung von freier [1- $^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure auf die *Spermatozoen* (4.3.1) sowie allgemein bekannter Schwierigkeiten bei einer Extrapolation der Toxizität im Bereich niedriger Konzentration, wurden auch die „Puls-Chase“-Untersuchungen mithilfe einer proteinvermittelten FS-Aufnahme, wie es bereits in 3.9.1 beschrieben wurde, durchgeführt. Eine ausführlichere Beschreibung der Puls-Chase-Markierungen ist Tabelle 6 zu entnehmen. Die Dauer der Pulsmarkierungen betrug 30 sek

(Experiment 3) sowie 10 und 30 min (Experiment 1, 2 und 4). Die Zugabe des Isotops in 1% (v/v) *p*-NaCl erfolgte jeweils zu Beginn der Markierungszeit („Puls“). Anschließend wurden die *Spermatozoen* mit BTS-Medium von den Resten der Radiochemikalie befreit und bei 17°C bis 48 Std weiter inkubiert („Chase“). Die Probenentnahme fand unmittelbar nach dem Puls (*Status quo*) sowie nach 24 und 48 Std statt und betrug jeweils 10 ml. Die Terminierung der Reaktionsansätze erfolgte durch die „Kochlyse“.

**Tabelle 5: Inkubationsvarianten. Puls-Chase-Markierungen mit [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure**

	Puls	Chase [Std]	Aktivität [μCi]	Zellzahl	Volumen
Experiment 1	30 min	1, 24, 48	0,5	0,66 10 <sup>9</sup>	30 ml
Experiment 2	10 min	0, 24, 48	0,5	0,66 10 <sup>9</sup>	30 ml
Experiment 3	30 sek	0, 24, 48	2	0,66 10 <sup>9</sup>	30 ml
Experiment 4	10 min	0, 24, 48	0,5	0,66 10 <sup>9</sup>	30 ml

Für die Proben im Experiment 4 wurden die Zellen zusätzlich nach dem Puls mit dem „Hungermedium“, welches anstelle des [1-<sup>14</sup>C]- ein [<sup>12</sup>C]-Isotop gleicher Endkonzentration von Octadecadiensäure enthielt, supplementiert.

### 3.9.7 Bestimmung der Stoffmenge von radioaktiv markierten Substraten

Die quantitative Bestimmung der Stoffmengen von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in den radioaktiven Lipiden, die sich von der [1-<sup>14</sup>C]-Fettsäuren ableiten, wurde mithilfe densitometrischen Quantifizierungen der Signale und einer bekannten Menge der im Experiment eingesetzten Radiochemikalie über die spezifische Aktivität berechnet. Für die densitometrische Quantifizierung der Signale wurde die AIDA Software (Raytest) verwendet.

### 3.10 Untersuchungen mit stabilen Isotopen

Eine Möglichkeit der Verwertung von Octadecadiensäure durch die porcinen *Spermatozoen*, sowie eine chemische Modifizierung durch die Komponenten des Seminalplasmas sind nicht in der Fachliteratur beschrieben. Somit kann ein Einbau in die Lipide der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Anhand der Supplementierungsexperimenten mit [<sup>12</sup>C] / [U-<sup>13</sup>C]-Isotopen, können Einblicke in den Metabolismus exogener sowie endogen vorkommender Fettsäuren gewonnen werden.

### 3.10.1 Supplementierung mit [<sup>12</sup>C]-Fettsäuren

Die  $2 \times 10^9$  *Spermatozoen* in 90 ml BTS-Medium wurden mit 3,5 µmol Octadecadiensäure und 1,4 µmol BSA bei unterschiedlichen Temperaturen (6°C, 10°C, 17°C und 24°C) während unterschiedlicher Zeiträume (bis zu 196 Std) inkubiert. So betrug die Endkonzentration zum Zeitpunkt der Applikation für Octadecadiensäure 39 µM und 17 µM entsprechend für BSA.

Die Supplementierung erfolgte unmittelbar nach der Gewinnung und Aufnahme der Zellen in BTS-Medium durch die Zugabe von 0,9 ml des 100× Mastermixes zur 90 ml BTS mit  $2 \times 10^9$  *Spermatozoen*.

100× Mastermix wurde kurz vor der Supplementierung der Zellen hergestellt:

980 µg Octadecadiensäure (L-1376, Sigma) wurde in 10 µl Ethanol (E-7023, Sigma) aufgelöst, danach in 1 ml sterilfiltriertem *p-NaCl*-Medium mit 100 mg BSA (A-7030, Sigma) aufgenommen.

Analog zur Supplementierung mit Octadecadiensäure wurden auch proteinvermittelte Supplementierungen mit Hexadecen-, Octadecen-, Octadecatrien-, und Eicosapentaensäure durchgeführt. Die Endkonzentration der Fettsäure betrug für jedes getesteten Variant 39 µM und 17 µM entsprechend für BSA.

### 3.10.2 Supplementierung mit [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäure

Die  $2 \times 10^9$  *Spermatozoen* in BTS-Medium wurden mit [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäure bei unterschiedlichen Temperaturen während unterschiedlicher Zeiten, wie bereits in Kapitel 3.10.1 beschrieben, inkubiert. Die Endkonzentration der [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäure betrug 39 µM, BSA entsprechend 17 µM. Die Supplementierung erfolgte unmittelbar nach der Gewinnung und Aufnahme der Zellen in BTS-Medium durch die Zugabe des 100 × Mastermixes.

## 3.11 Mikrobiologische Untersuchungen

Nach der Entnahme lassen sich in jedem Ejakulat Bakterien nachweisen. Bakterien sind in der Lage exogene Fettsäuren aufzunehmen (Black and DiRusso, 1994) und diese zu verwerten (Hou, 1994, 2000; Hou *et al.*, 1997). Daher sollte bei Markierungsexperimenten von *Spermatozoen* auch Kontrollexperimente, welche eine

bakterielle Verwertung supplementierter Fettsäure verfolgen, durchgeführt werden. Bei der bakteriellen Verwertung der Fettsäure ist sowohl mit  $\beta$ - und  $\alpha$ -Oxidation sowie dem möglichen metabolischen Einbau in bakterielle Lipide zu rechnen. Da in dieser Arbeit verwendete Octadecadiensäure [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] markiert ist, fand die Zugabe des Radioisotops erst nach der Anwachsphase statt, dadurch ließ sich ein Blindabbau des Substrates vermeiden.

### **3.11.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien**

Die Bakterien wurden zunächst im BTS-Medium durch das Einimpfen vorkultiviert. Dazu wurden in 40 ml des BTS-Mediums 10 ml BTS-Medium mit *Spermatozoen* in einem Erlenmeyerkolben bei RT zugegeben. Jeweils nach 1-2 Tagen wurde 1% der Kultur in frisches BTS-Kulturmedium überführt (Hauptkultur). Die Flüssigkulturen wurden durch Schütteln oder Rotation (100-150 rpm) belüftet. Als Kontrolle fand die Anzucht der Hauptkultur ohne zusätzliche Belüftung statt. Es galten gleiche Bedingungen wie bei flüssigkonservierten *Spermatozoen*.

#### Zelldichte:

Die Zelldichte einer unbekanntes Kultur im Flüssigmedium wurde photometrisch in Anlehnung an einer *E. coli*-Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt: Der Wert „0.5“ [ $OD_{600}$ ] entsprach  $0.5 \text{ bis } 1 \times 10^9$  Zellen / ml. Erst nach dieser Anwachsphase wurde die [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure zugegeben (3.9.3). Nach einer Inkubationsdauer von 24 bzw. 48 Stunden wurden entstandene Produkte sowohl aus dem Medium als auch aus dem im Verlauf der Aufarbeitung anfallenden Bakterienpellet extrahiert.

### **3.11.2 Bakterieller Kontaminationsstatus**

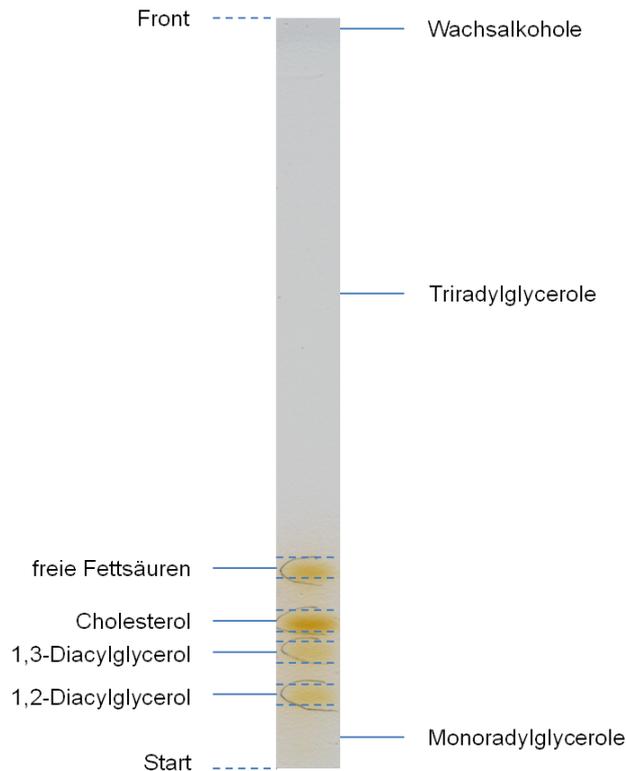
Die Bestimmung der Bakterienarten wurde am Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW, Abteilung Bakteriologie) zytochemisch mittels eines kommerziellen Testsystems durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Schwerpunkte. Der erste Teil befasst sich mit dem Einbau von exogenen Fettsäuren in porcine Spermatozoenlipide. Dazu wurden zunächst die Lipid- und anschließend die Fettsäurezusammensetzung von porcinen *Spermatozoen* untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde dann der Einbau von exogenen Fettsäuren radiochemisch sowie massenspektrometrisch untersucht. Der zweite Teil befasst sich mit der Auswirkung von exogenen Fettsäuren auf die physiologischen Parameter porciner *Spermatozoen* während der Flüssigkonservierung bei niedrigen (16°C und 6°C) Temperaturen. Dazu wurden Motilität, Vitalität sowie akrosomaler Status untersucht. Anschließend wurden die physiologischen Unterschiede bei den mit exogenen Fettsäuren supplementierten und den unbehandelten flüssigkonservierten *Spermatozoen* während der Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen verglichen.

### 4.1 Lipidzusammensetzung von porcinen Spermatozoen

Die Zusammensetzung und Organisation der Membranen porciner *Spermatozoen* zeigt Unterschiede zwischen Rassen, Individuen und Ejakulaten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den Rassen Piétrain und Duroc gearbeitet. Zur Analyse der Lipidzusammensetzung erfolgte eine Gesamtlipidextraktion (3.6.1) gefolgt von der Identifizierung einzelner Lipidklassen mittels Dünnschichtchromatographie (3.6.2). Referenzsubstanzen dienten für die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen. Desweiteren wurden alle Hauptlipidklassen nach einer präparativen Aufreinigung der einzelnen Spots (3.6.1.3) durch massenspektrometrische Analysen (3.7) untersucht. Im Vergleich zu somatischen Zellen kommen bei den *Spermatozoen* neutrale Lipide in wesentlich höheren Mengen vor (Nikolopoulou et al., 1985; Zanetti et al., 2010b). Daher wurden zuerst die neutralen Lipide porciner *Spermatozoen* mittels Dünnschichtchromatographie auftrennt (Abb. 10).



**Abbildung 10: Dünnschichtchromatographische Auftrennung neutraler Lipide eines Gesamtlipidextraktes flüssigkonservierter porciner Spermatozoen**

Die neutralen Lipide von flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen* umfassen freie Fettsäuren, Cholesterol, und Diacylglycerole (DAG). Wachsalkohole sowie Tri- und Monoradylglycerole (*diacyl-*, *plasmanyl-*, und *plasmenyl-*Spezies von TRG und MRG) wurden nicht nachgewiesen; Die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen erfolgte anhand der  $R_f$ -Werte von Referenzsubstanzen. Iod-Farbreaktion, die Auftrennung erfolgte in *n*-Hexan / Diethylether / Eisessig (80:15:1); DC-Platten: SI<sub>250</sub> PA 7003-04, J.T. Baker.

Die Analyse zeigt, dass neutrale Lipide von flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen* Cholesterol, Diacylglycerole (DAG) und freie Fettsäuren umfassen. Das Vorkommen von DAG und Cholesterol in porcinen *Spermatozoen* wurde bereits beschrieben (Nikolopoulou et al., 1986; Roldan and Harrison, 1992; Vazquez and Roldan, 1997a). Daten über das Vorkommen von freien Fettsäuren in porcinen *Spermatozoen* liegen in der Fachliteratur nicht vor. Zanetti *et al.* (2010b) berichteten jedoch über freie Fettsäuren in den Lipiden der *Rattus Spermatozoen*. Unter den hier angewendeten experimentellen Bedingungen konnten keine Wachsalkohole, Tri- sowie Monoradylglycerole nachgewiesen werden. Die Diacylglycerole porciner *Spermatozoen* kommen als zwei Regioisomere 1,2-DAG und 1,3-DAG vor. Beide Isomere haben unterschiedliche Auswirkungen auf biologische- und Modell-Membranen (Gómez-Fernández and Corbalán-García, 2007; Sanchez-Migallon *et al.*, 1995).

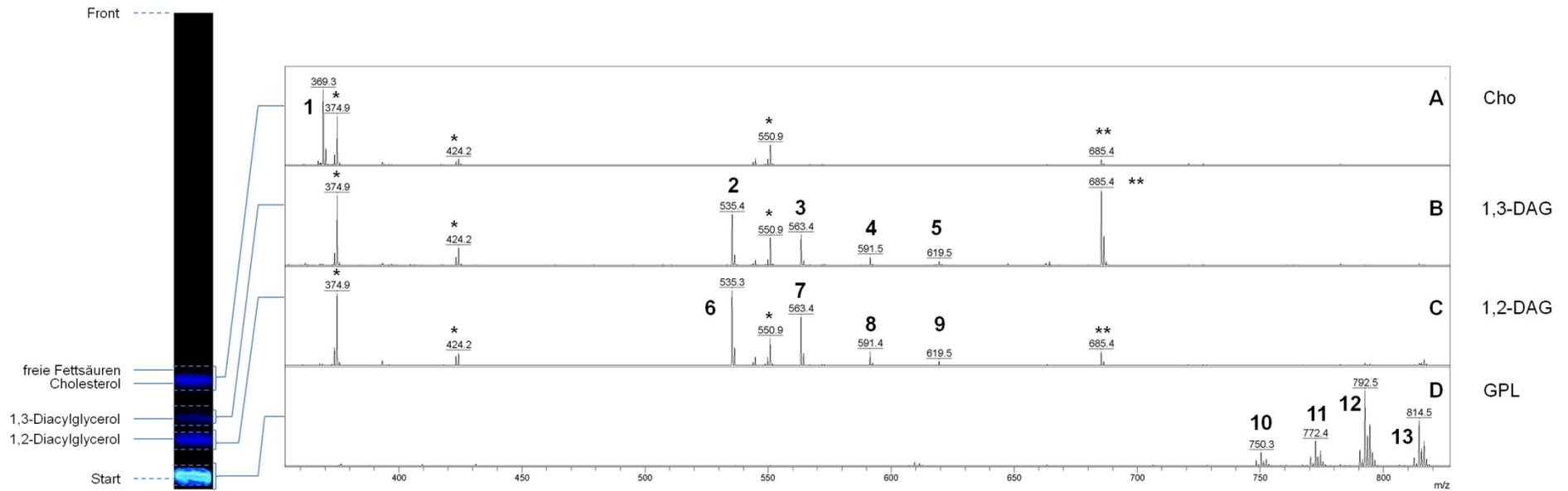
Die Isomerisierung von 1,2- bzw. 2,3-DAG zu 1,3-DAG könnte ein experimentell bedingtes Artefakt sein. So wurde in der Arbeit von Kodali *et al.* (1990) beschrieben, dass bereits nach einer zwanzigminütigen dünnschichtchromatographischen Auftrennung von 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol in Chloroform / Aceton auf Kieselgelplatten bei 24°C eine geringfügige Isomerisierung zu 1,3-Dipalmitoylglycerol stattgefunden hat. Bereits eine Stunde nach dem Auftragen von 1,2-DAG und der Entwicklung der dünnschichtchromatographischen Platten erfolgte bei 34% der Ausgangssubstanz die Isomerisierung zu 1,3-DAG. Daher wurden bei allen hier durchgeführten Experimenten die Zeitabstände zwischen Probenauftrag, Visualisierung und präparativer Aufreinigung der Lipide so gering wie möglich gehalten, jedoch konnte eine spontane Isomerisierung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine weitere Erklärung für das Vorkommen der 1,3-DAG-Isomere in Spermatozoenlipide könnte durch die Aufnahme von 1,3-DAG über Tierfuttermittel sein. Diese enthalten unter anderem freie Fettsäuren und Fette (Am-In *et al.*, 2011). Diese können entweder aus natürlichen Quellen stammen („*natural fats*“) oder synthetisch aufbereitet sein („*synthetic natural fats*“). „*Synthetic natural fats*“ werden in der Regel durch lipasekatalysierte Verfahren aus Produktionsrückständen von Fetten und Ölen hergestellt. Diese werden im Vakuum ohne Lösungsmittel mit immobilisierten Lipasen versetzt. Dadurch entstehen die Gemische von 1,2- und 1,3-DAG. Die so entstandenen DAG-Isomere werden anschließend durch Vakuumdestillation gereinigt und als Nahrungsergänzungsmittel, Emulgatoren und als Bestandteile von pharmazeutischen, kosmetischen und technischen Produkten verwendet. In dieser Arbeit wird nicht näher auf die industrielle Herstellung fetthaltiger Komponenten von Futtermitteln, sowie auf ihre Verabreichung bei der Fütterung, auf die Metabolisierung und den Nachweis von DAG-Isomeren eingegangen (Crossley *et al.*, 1959; Fagan *et al.*, 2004; Gee and Goh, 2001; Gertz and Fiebig, 2006; Ichihara and Noda, 1982; Kodali *et al.*, 1990; Lubary *et al.*, 2011; Realini *et al.*, 2010; Rudkowska *et al.*, 2005; Shereena and Thangaraj, 2009).

*Bis dato* liegen kaum Angaben über Zusammensetzung und die Strukturanalytik der neutralen Lipide tierischer *Spermatozoen* vor. Daher wurden in dieser Arbeit die neutralen Lipide porciner *Spermatozoen* massenspektrometrisch untersucht. Diese wurden zuerst dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und visualisiert. Die

einzelnen Lipidspots wurden dann einer präparativen Aufreinigung unterzogen und anschließend mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Dafür wurden die Lipid-Proben in Chloroform gelöst und dann eine „Matrix“ (Dihydroxybenzoesäure, 2-DHB) zugegeben. Nach dem Trocknen liegt die zu analysierende Probe in Form von Mischkristallen vor. Durch einen Laserpuls werden die Matrixmolekülonen angeregt und lokal erhitzt. Dies führt zur Bildung von Addukt-Ionen, so genannten Quasimolekülonen. Diese sind bei positiver Ionendetektion die Anlagerungsprodukte von Protonen, Natrium- oder Ammoniumionen. Im Massenanalysator werden diese getrennt und dann vom Detektor nach ihrem Masse / Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) getrennt registriert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 sowie in Tabelle 6 dargestellt.

Entsprechend den MALDI-TOF-MS Analysen sind Diacylglycerole und Cholesterol die Hauptkomponente der neutralen Lipide von flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen*. Die Auswertung der detektierten Massen von DAG-Quasimolekülonen hat gezeigt, dass 1,2- und 1,3-DAG-Isomere durch gesättigte Fettsäurereste charakterisiert sind (Abb. 11, Tab. 6 B-C). Die Intensität der jeweils nachgewiesenen Molekülonen weist darauf hin, dass die Diacylglycerole in flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen* durch DAG 28:0 und 30:0 vertreten sind. Diese können wahrscheinlich DAG (14:0 / 14:0) und DAG (14:0 / 16:0) zugeordnet werden. DAG-Spezies mit ungesättigten oder mit langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (VL-PUFA) konnten nicht detektiert werden. Glycerophospholipide werden in diesem Laufmittel nicht aufgetrennt und befinden sich somit am Start (Abb.11 D, Tab. 6 D).

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 11: Identifizierung der neutralen Lipide porciner Spermatozoen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

**Links:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung eines Gesamtlipidextraktes von flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen*, Primulin-Farbreaktion. Die Auftrennung erfolgte in *n*-Hexan / Diethylether / Eisessig (80:15:1), DC-Platten: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> 10 × 10 cm, Merk

**Rechts:** MALDI-TOF-Massenspektren der jeweiligen Lipidklasse mittels positiver Ionen-Detektion. Die einzelnen Lipidspots wurden präparativ aufgereinigt und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

**A.** Cholesterin (Cho), **B.** 1,3-Diacylglycerole (1,3-DAG), **C.** 1,2-Diacylglycerole (1,2-DAG), **D.** Glycerophospholipide (GPL)

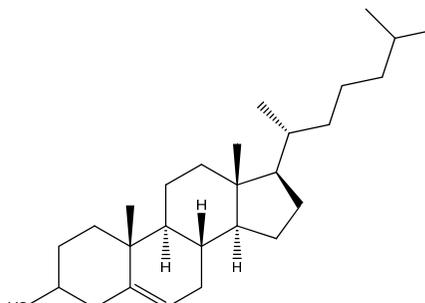
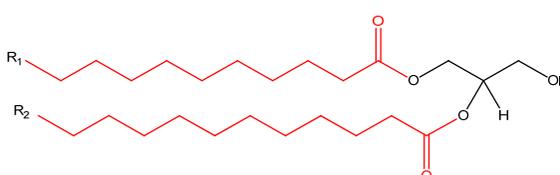
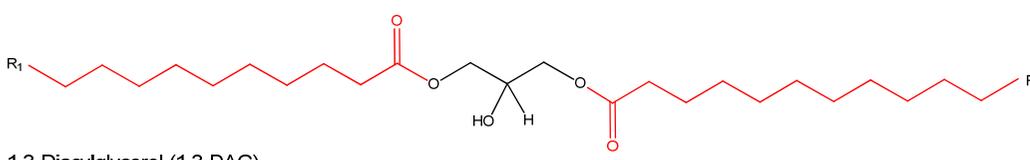
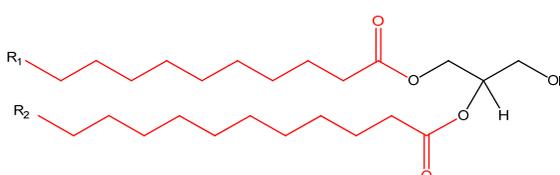
Glycerophospholipide werden in diesem Laufmittel nicht aufgetrennt und befinden sich somit am Start;

\*: Matrix-Molekulation, \*\*: Tinuvin-144;

Ausführlichere Erläuterungen zu den jeweiligen Lipidspezies (**1-13**) der einzelnen Lipidklassen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

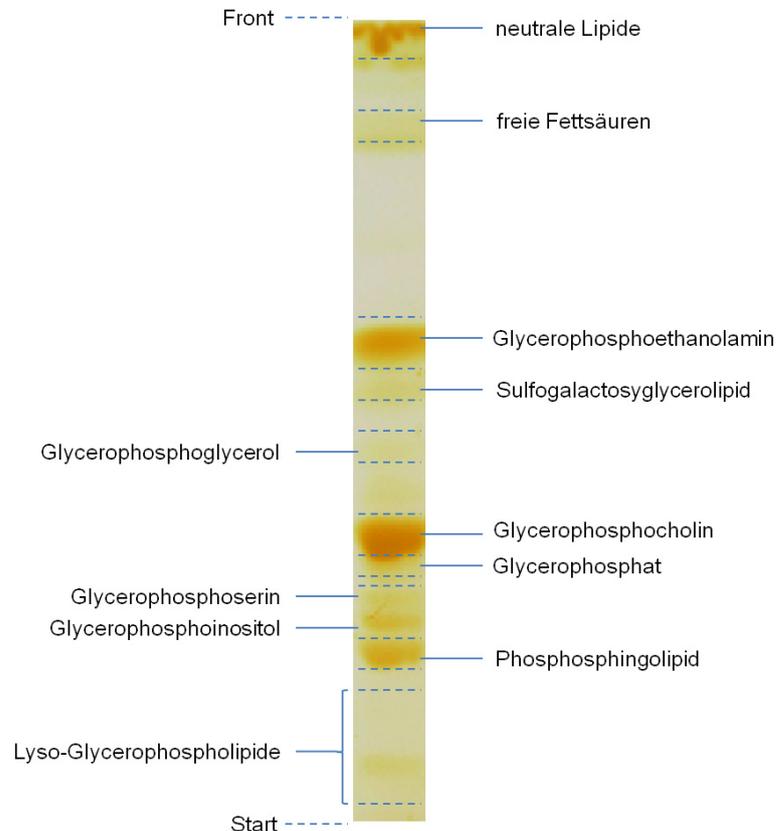
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tabelle 6: MALDI-TOF-Identifizierung der neutralen Lipide von flüssigkonservierten porcinen Spermatozoen**

Peak	Lipidklasse / Lipidspezies	[M+H] <sup>+</sup>	Strukturformeln
<b>A. Sterole</b>			
1	Cholesterol (Cho) [M-H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	369,2	
<b>B. 1,3-Diacylglycerole (1,3-DAG)</b>			
2	DAG (28:0)	535,4	
3	DAG (30:0)	563,5	
4	DAG (32:0)	591,5	
5	DAG (34:0)	619,5	
<b>C. 1,2- bzw. 2,3-Diacylglycerole (1,2-DAG)</b>			
6	DAG (28:0)	535,4	
7	DAG (30:0)	563,5	
8	DAG (32:0)	591,5	
9	DAG (34:0)	619,5	
<b>D. Glycerophospholipide (GPL)</b>			
10	Ether-GPE (38:6) / -GPS (32:5) / -GPC (34:6)	750,5	
11	Ether-GPE (38:2) / -GPC (36:2) / -GPS (36:3)	772,6	
12	diacyl-GPE (40:6) / -GPC (38:6) / Ether GPS (38:7)	792,6	
13	diacyl-GPE (42:9) / -GPC (38:2) / -GPS (38:3) / Ether GPE (42:2) / -GPC (40:9)	814,6	

In MALDI-TOF-MS (Matrix: 2,5-DHB) werden bei positiver Ionendetektion Diacylglycerole ausschließlich als [M+Na]<sup>+</sup>- aber Glycerophospholipide als [M+H]<sup>+</sup>- und [M+Na]<sup>+</sup>-Quasimolekülonen detektiert (Schiller *et al.*, 2007). In der Abbildung sind Acylreste rot markiert. Ausführliche Erläuterungen zu Glycerophospholipiden siehe Abb. 13, Tab. 7. Es ist Bruttofettsäurekomposition angegeben. 36:4 stellt beispielweise Gesamtzahl von 36 C-Atomen in den Acylresten (R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>) sowie vier Doppelbindungen dar.

Zur Analyse der polaren Lipide porciner *Spermatozoen* wurden diese zuerst dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen anschließend mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12: Dünnschichtchromatographische Auftrennung polarer Lipide eines Gesamtlipidextraktes flüssigkonservierter porciner *Spermatozoen***

Iod-Farbreaktion, die Auftrennung erfolgte in Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O (65:25:4)

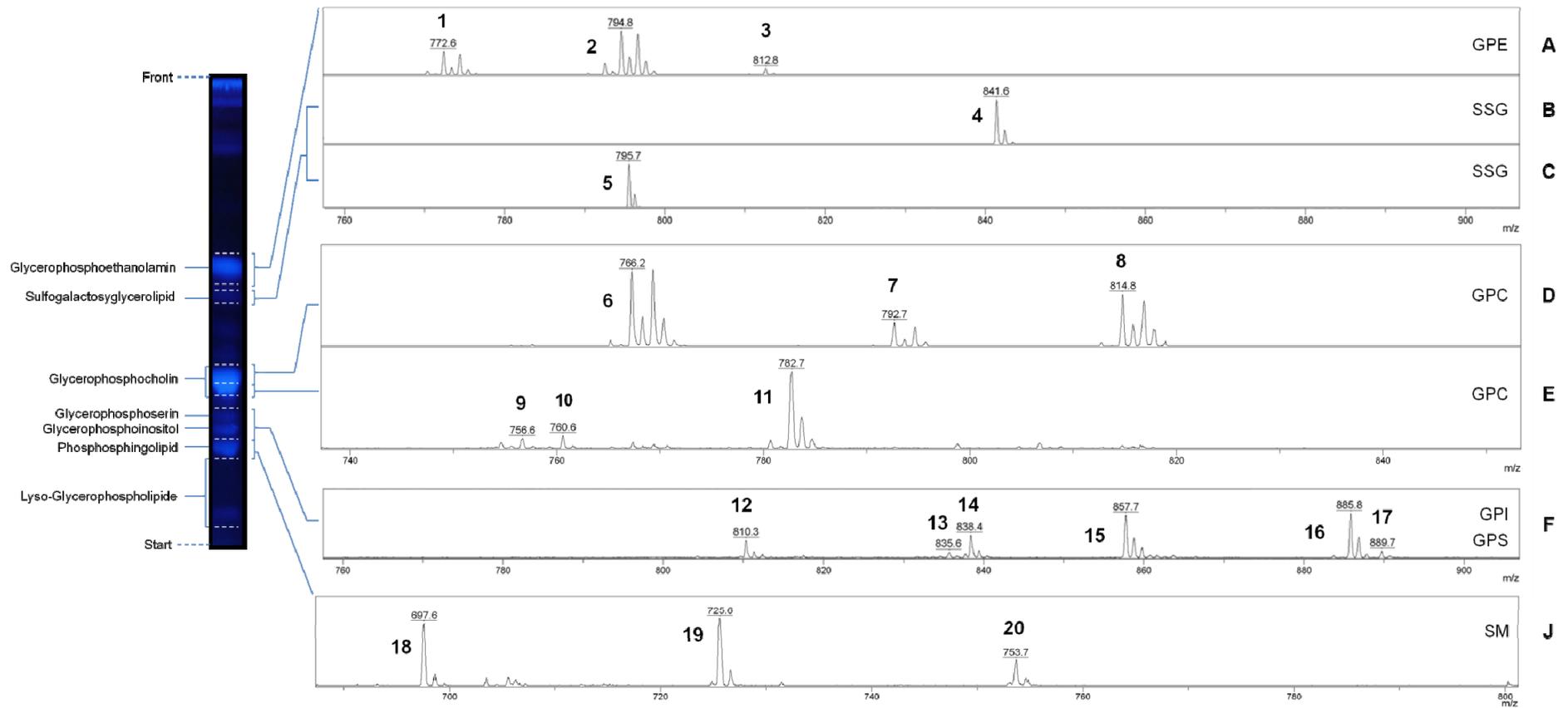
DC-Platten: SI<sub>250</sub> PA 7003-04, J.T. Baker

Die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen erfolgte anhand der  $R_f$ -Werte von Referenzsubstanzen, und anhand der Farbreaktionen folgender Lipidklassen: Sulfoglycoglycerolipid, Glycerophosphoethanolamin, Glycerophosphoserin (3.6.1.3).

Die Analyse zeigt, dass die Glycerophospholipide (GPL) die Hauptvertreter der porcinen Spermatozoenlipide sind. Glycerophosphocholin (GPC) und Glycerophosphoethanolamin (GPE) sind dabei die dominierende GPL (Abb. 12). Das stimmt mit den von Evans *et al.* (1980) gezeigten Daten überein. Weitere Lipidklassen sind Glycerophosphoserin (GPS), Glycerophosphoinositol (GPI), Phosphosphingolipide und Sulfoglycoglycerolipid (SGG). Die Identifizierung der polaren Lipidklassen und deren Spezies wurden mittels MALDI-TOF-MS verifiziert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 13 sowie in der Tabelle 7 dargestellt.

Bei den MALDI-TOF-massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgte die Zuordnung der experimentell ermittelten Massen von Quasimolekülonen anhand der zuvor berechneten Isotopenmassen dieser Ionen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass in den beiden Hauptlipidklassen porciner *Spermatozoen* (GPC und GPE) sowohl *diacyl*- als auch Ether-Spezies vorkommen (Abb. 13, Tab. 7). Dies stimmt mit den von Evans *et al.* (1980) gezeigten Daten überein. Weitere GPL von porcinen *Spermatozoen* sind Glycerophosphoserin (GPS), Glycerophosphoinositol (GPI) und Sphingomyelin (SM). Für GPS und GPI keine Ether-Lipidspezies nachgewiesen werden. Die beiden Lipidklassen GPS und GPI beinhalten ausschließlich *diacyl*-Spezies. Anhand der berechneten Massen der detektierten Quasimolekülonen sind GPL durch langkettige mehrfach ungesättigte Reste (Fettsäuren, Fetaldehyde) gekennzeichnet. Die Glycoglycerolipide kommen in porcinen *Spermatozoen* nur als Sulfogalactosylglycerolipide (SGG) vor und sind durch 16:0-Alkyl- und 16:0-Acylreste charakterisiert. Es handelt sich somit um *plasmanyl*-SGG (32:0). Zahlreiche Arbeiten haben dies bereits gezeigt (Evans *et al.*, 1980; Ishizuka *et al.*, 1973; Lessig *et al.*, 2004). Mittels Iod- sowie Primulin-Farbreaktion konnte gezeigt werden, dass Glycerophosphat, Glycerophosphoglycerol und die Lysoformen von GPL im Vergleich zu den cholin- und ethanolaminhaltigen GPL in deutlich geringeren Mengen vorkommen, so dass diese nicht weiter untersucht wurden.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 13: Identifizierung der polaren Lipide porciner Spermatozoen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

**Links:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung eines Gesamtlipidextraktes von flüssigkonservierten porcinen Spermatozoen, Primulin-Farbreaktion. Die Auftrennung erfolgte in Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O (65:25:4), DC-Platten: SI<sub>250</sub> PA 7003-04, J.T. Baker.

**Rechts:** MALDI-TOF-Massenspektren der jeweiligen Lipidklasse mittels positiver Ionen-Detektion, bei Probe C (Peak 5) mittels negativer Ionen-Detektion. Die einzelnen Lipidspots wurden präparativ aufgereinigt und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

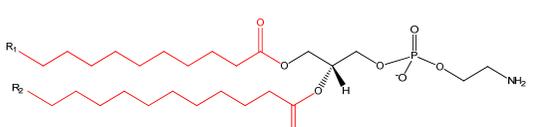
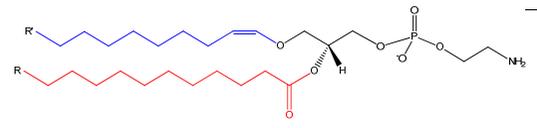
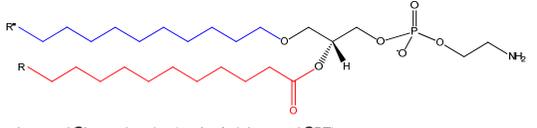
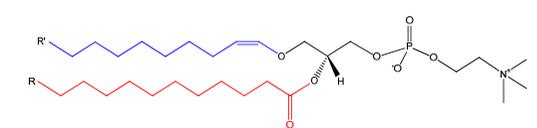
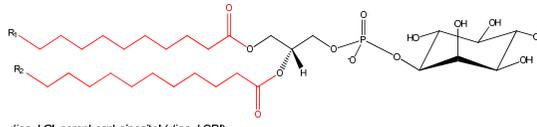
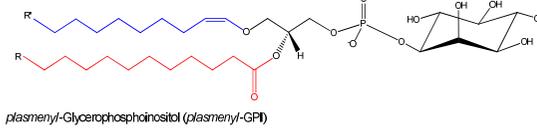
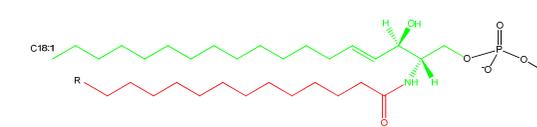
**A.** Glycerophosphoethanolamin (GPE), **B. / C.** Sulfogalactosylglycerolipid (SSG), **D. / E.** Glycerophosphocholin (GPC),

**F.** Glycerophosphoserin (GPS), Glycerophosphoinositol (GPI), **J.** Phosphosphingolipid: Sphingomyelin (SM).

Ausführlichere Erläuterungen zu den jeweiligen Lipidspezies (**1-20**) der einzelnen Lipidklassen sind Tabelle 7 zu entnehmen.

# ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tabelle 7: MALDI-TOF-Identifizierung der polaren Lipide von flüssigkonservierten porcinen Spermatozoen**

Peak	Lipidklasse / Lipidspezies	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	Strukturformeln
<b>A. Glycerophosphoethanolamin (GPE)</b>				
1	diacyl-GPE (38:2)	772,6	794,6	 <i>diacyl</i> -Glycerophosphoethanolamin ( <i>diacyl</i> -GPE)
2	diacyl-GPE (40:5)	794,6		
3	Ether-GPE (42:3)	812,7		
<b>B. IC. Sulfolactosylglycerolipid (SGG)</b>				
4	plasmanyl-SGG (32:0), [M-H+2Na] <sup>+</sup>		841,5	 <i>plasmanyl</i> -Glycerophosphoethanolamin ( <i>plasmanyl</i> -GPE)
5	plasmanyl-SGG (32:0), [M-H] <sup>+</sup>	795,6		
<b>D./E. Glycerophosphocholin (GPC)</b>				
6	Ether-GPC (36:5)	756,5	814,6	 <i>plasmanyl</i> -Glycerophosphocholin ( <i>plasmanyl</i> -GPC)
7	Ether-GPC (38:6)	792,6		
8	diacyl-GPC (38:2)	814,6		 <i>plasmanyl</i> -Glycerophosphocholin ( <i>plasmanyl</i> -GPC)
9	diacyl-GPC (34:3)	756,6		
10	diacyl-GPC (34:1)	760,6	782,6	
11	Ether-GPC (40:4)	782,6		
<b>F. Glycerophosphoserin (GPS)</b>				
12	diacyl-GPS (38:5)	810,5	838,5	 <i>diacyl</i> -Glycerophosphoserin ( <i>diacyl</i> -GPS)
14	diacyl-GPS (40:5)	838,5		
<b>F. Glycerophosphoinositol (GPI)</b>				
13	diacyl-GPI (34:2)	835,5	857,5	 <i>diacyl</i> -Glycerophosphoinositol ( <i>diacyl</i> -GPI)
15	diacyl-GPI (36:5)	857,5		
16	diacyl-GPI (38:5)	885,5		
17	diacyl-GPI (38:3) / Ether-GPI (40:10)	889,6		
<b>F. Sphingomyelin (SM)</b>				
18	SM (d18:1/14:0)		697,4	 Sphingomyelin
19	SM (d18:1/16:0)		725,6	
20	SM (d18:1/18:0)		753,5	

Bei der MALDI-TOF-MS (Matrix: 2,5-DHB) werden unter positiver-Ionen-detektion Glycerophospholipide als [M+H]<sup>+</sup>- und [M+Na]<sup>+</sup>-Quasimoleküle dargestellt (Schiller *et al.*, 2007). In der Abbildung sind Acylreste (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>) rot und Alkylreste (R': ein Alken, R'': ein Alkan) blau markiert. Sphingomyelin: Sphingoid-Grundgerüst (18:1) ist grün und N-Acylrest (R) entsprechend rot dargestellt. Es ist Bruttofettsäurekomposition angegeben. 36:4 stellt beispielweise Gesamtzahl von 36 C-Atomen in den Acylresten (R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>) sowie vier Doppelbindungen dar.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit gezeigt, dass sich die Verhältnisse von einzelnen Lipidklassen und Lipidspezies porciner *Spermatozoen* sowohl untereinander als auch voneinander deutlich unterscheiden. Glycerophosphocholine und Glycerophosphoethanolamine sind die Hauptlipidklassen der Glycerophospholipide und sind durch langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Fettaldehyde gekennzeichnet. Alle Glycerophospholipide, mit Ausnahme von Glycerophosphoserin, kommen als *diacyl*- und Ether-Lipide vor. Einziger Vertreter der Glycoglycerolipide ist Sulfogalactosylglycerolipid. Die Hauptvertreter der neutralen Lipide sind die Diacylglycerole mit mittelkettigen, gesättigten Fettsäuren. Da diese die Vorstufe für die Biosynthese von langkettigen, mehrfach ungesättigten Glycerophospholipiden sind, kann angenommen werden, dass in den flüssigkonservierten porciner *Spermatozoen* unter diesen Bedingungen (BTS-Medium, 17°C) keine aktive Biosynthese von VL-PUFA-GPL stattfindet. Dies sollte anhand nachfolgender Experimente überprüft werden.

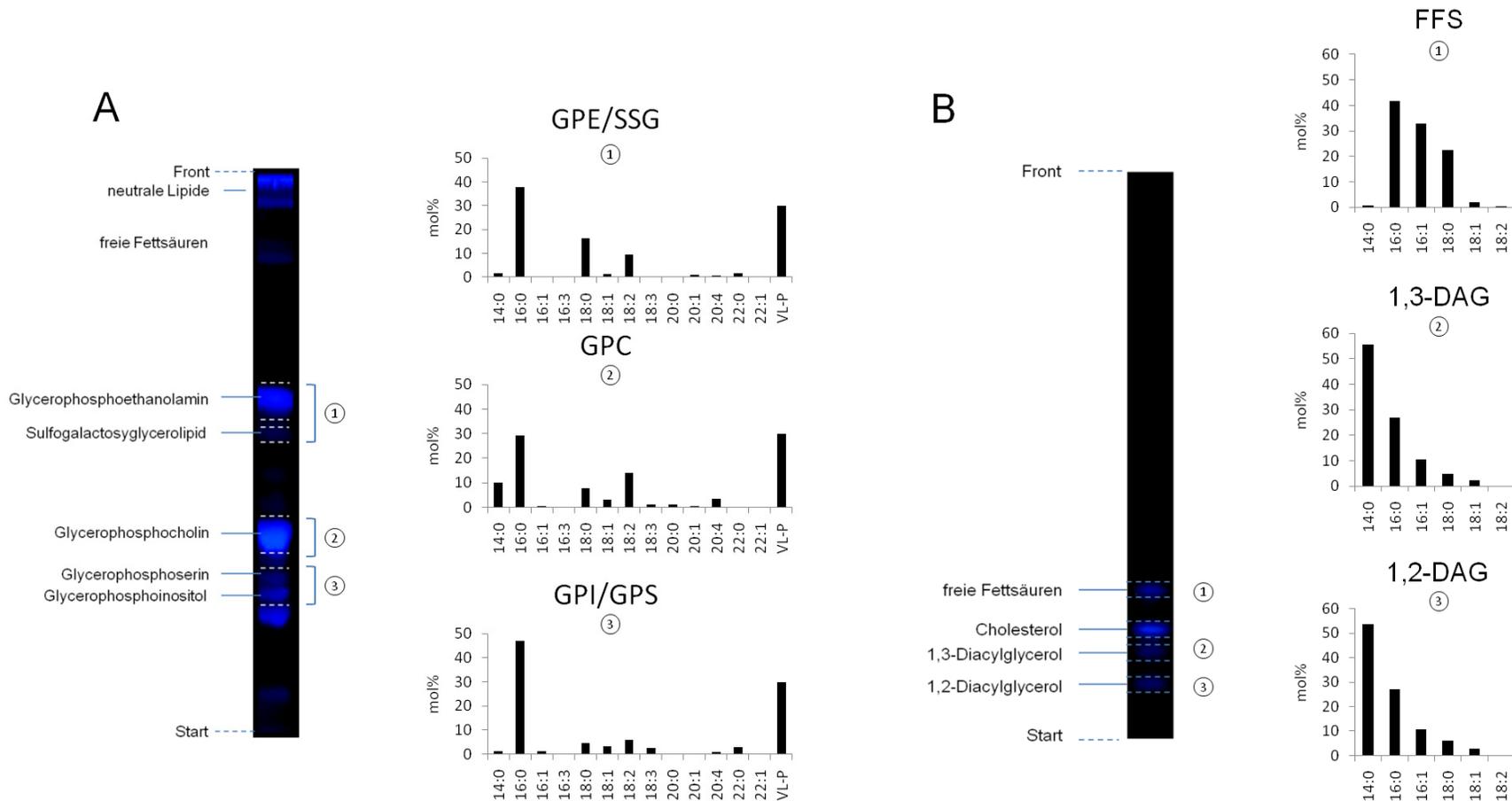
### **4.2 Vorkommen von Octadecadiensäure in den Lipiden von porcinen Spermatozoen**

Bisher wurde in der Literatur vor allem das Vorkommen von Octadecadiensäure in Plasmamembranlipiden von porcinen *Spermatozoen* der Rassen Landrace und Duroc beschrieben (Waterhouse *et al.*, 2006). Vergleichende Untersuchungen der Gesamtlipidzusammensetzung porciner und humaner *Spermatozoen* (Lessig *et al.*, 2004) haben gezeigt, dass in porcinen *Spermatozoen* die Octadecadiensäure in wesentlich geringer Menge repräsentiert ist. In der Untersuchungen von Am-In *et al.* (2011) wurde berichtet, dass die Octadecadiensäure in dem Gesamtlipidextrakt unterschiedlicher porciner Rassen mit etwa 15 mol% vertreten ist. Die langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (VL-PUFA) sind in Plasmamembranglycerophospholipiden porciner *Spermatozoen* mit etwa 30 mol% vertreten (Am-In *et al.*, 2011; Waterhouse *et al.*, 2006). VL-PUFA weisen in den porcinen *Spermatozoen* eine Kettenlänge bis hin zu 34-Kohlenstoffatomen auf (Poulos *et al.*, 1986). Daten über die Fettsäurezusammensetzung der neutralen Lipide porciner *Spermatozoen* liegen in der Fachliteratur nicht vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels MALDI-TOF-MS gezeigt, dass die *Acyl*-Reste der Diacylglycerole ausschließlich als mittelkettige, gesättigte Fettsäuren vorliegen (4.1).

Da die Octadecadiensäure eine langkettige, ungesättigte Fettsäure ist, wurde angenommen, dass diese bei den neutralen Lipiden porciner *Spermatozoen* nicht vorhanden ist. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses und zur weiteren Quantifizierung der Fettsäurezusammensetzung wurde das endogene Vorkommen dieser Fettsäure in den Hauptlipidklassen der *Spermatozoen* der Rasse Piétrain mittels Gaschromatographie untersucht. Nach der Gesamtlipidextraktion (3.6.1) wurden zunächst die einzelnen Lipidklassen mittels Dünnschichtchromatographie (3.6.2) fraktioniert. Nach einer präparativen Aufreinigung (3.6.1.3) der Proben wurden diese dann einer säurekatalysierten Transmethylierung unterzogen (3.8.1) und anschließend mittels Gaschromatographie (GC-FID) analysiert (3.8.2.1). Im Fokus dieser Untersuchungen stand die Überprüfung des endogenen Vorkommens von Octadecadiensäure. Die VL-PUFA-Referenzsubstanzen standen für die gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuren nicht zu Verfügung und wurden daher wie in der Literatur angegeben mit 30 mol% berücksichtigt (3.8.2). Die ermittelten Werte sind in der Abbildung 14 dargestellt.

Die Untersuchungen der Fettsäurezusammensetzung polarer Lipide porciner *Spermatozoen* zeigten, dass die Octadecadiensäure in den Glycerophospholipiden endogen vorhanden ist. Das stimmt mit den bereits publizierten Daten überein (Am-In et al., 2011; Waterhouse et al., 2006). Sie kommt in allen hier untersuchten GPL-Fractionen mit einem Anteil von 15 mol% in der Glycerophosphocholin- und mit 10 mol% in der Glycerophosphoethanolamin-Sulfogalactosylglycerolipid-Fraktion vor. Die 16:0-Fettsäure ist vorherrschend mit bis zu 50 mol% in der Glycerophosphoserin / Glycerophosphoinositol-Fraktion. Weitere Fettsäuren sind die gesättigten 14:0-, und 18:0-Fettsäuren mit bis zu 10 mol% bzw. bis zu 15 mol%. Die einfach-ungesättigten sowie mehrfach-ungesättigten Fettsäuren 18:1-, 18:3-, 20:1- und 20:4 liegen in deutlich geringeren Mengen (<3 mol%) vor. Das Vorkommen der 16:3-Fettsäure konnte nicht beobachtet werden (Abb. 14, A).

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 14: Fettsäurezusammensetzung der Hauptlipidklassen flüssigkonservierter porciner Spermatozoen der Rasse Piétrain**

**A.** Polare Lipide: GPE / SGG: Glycerophosphoethanolamin / Sulfogalactosylglycerolipid; GPC: Glycerophosphocholin; GPI / GPS: Glycerophosphoserin / Glycerophosphoinositol. Die Lipidspots wurden präparativ aufgereinigt und einer säurekatalysierten Transmethylierung unterzogen. Die Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch (GC-FID) quantifiziert. Die langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren VL-PUFA (in der Abb. VL-P) wurden mit 30 mol% berücksichtigt, da keine geeigneten Standards zu Verfügung standen (3.8.2.1); **B.** Neutrale Lipide: FFS: freie Fettsäuren; 1,2-DAG: 1,2-Diacylglycerol; 1,3-DAG: 1,3-Diacylglycerol. Die Lipidspots wurden ebenfalls präparativ aufgereinigt und einer säurekatalysierten Transmethylierung unterzogen. Die Fettsäuremethylester wurden mittels gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) quantifiziert (3.8.2.2).

Auftrennung des Gesamtlipidextraktes über DC erfolgte in A. Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O (65:25:4) und in B. *n*-Hexan / Diethylether / Eisessig (80:15:1), jeweils mit DC-Platten SI<sub>250</sub> PA 7003-04, J.T. Baker.

Anhand des Vergleichs der Fettsäurezusammensetzung von neutralen und polaren Lipiden sind deutliche Unterschiede zu verzeichnen. Das endogene Vorkommen von Octadecadiensäure (18:2) als auch von VL-PUFA konnte in keiner der untersuchten neutralen Lipidklassen mittels Gaschromatographie und gekoppelter gaschromatographischer Massenspektrometrie (GC-MS) beobachtet werden. Die Fettsäurezusammensetzung der beiden Diacylglycerol-Isomere ist nahezu identisch. Die vorherrschenden Fettsäuren sind 14:0 und 16:0 mit einem Anteil von 55 mol% bzw. 25 mol%. Die restlichen 20 mol% sind durch 16:1, 18:0, 18:1-Fettsäuren vertreten. Sowohl die Abwesenheit von Octadecadiensäure als auch die Fettsäurezusammensetzung der neutralen Lipide stimmt mit den vorangegangenen MALDI-TOF-massenspektrometrischen Untersuchungen überein (4.1).

Es ist bekannt, dass *Spermatozoen* zu einer aktiven Lipidbiosynthese befähigt sind (Vazquez and Roldan, 1997b). DAG ist die Vorstufe für die Biosynthese von GPL in eukaryotischen Zellen (Gibellini and Smith, 2010). Der abschließende Schritt der *de-novo*-GPL-Biosynthese ist ein Kopfgruppen-Transfer auf 1,2-DAG (Bishop and Bell, 1988). Bei der GPC-Biosynthese wird beispielweise die Cholin-Kopfgruppe durch Cholinephosphotransferase übertragen. GPC und GPE von porcinen *Spermatozoen* sind vor allem durch mehrfach ungesättigte, langkettige Fettsäuren gekennzeichnet (4.1). Diese lassen sich jedoch nicht in 1,2-DAG und im freien Fettsäurepool der flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen* nachweisen (Abb.14, B). Auch ein enzymatischer Abbau von Glycerophospholipiden durch Phospholipasen (PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>) zu Lyso-GPL (mono-GPL) und freien Fettsäuren wurde nicht beobachtet (Abb. 14, A). Da DAG nur mittelkettige, gesättigte Fettsäuren enthält, kann angenommen werden, dass in den morphologisch-intakten porcinen *Spermatozoen*, die keine Akrosomreaktion zeigen und bei 17°C in BTS-Medium gelagert wurden, keine aktive *diacyl*-Lipidbiosynthese von langkettigen mehrfach-ungesättigten GPL stattfindet.

Sowohl das Sekret der akzessorischen Drüsen, das sogenannte Seminalplasma als auch die Eileitersekrete enthalten PUFA und VL-PUFA, sowie deren Transport-Proteine (Am-In *et al.*, 2011; Iritani *et al.*, 1969; Kalic *et al.*, 1997). Die *Spermatozoen* werden bei der Ejakulation mit dem Seminalplasma und später nach Erreichen des Eileiters mit den Eileitersekreten vermischt und kommen erst dadurch mit den freien

Fettsäuren in Kontakt. Gleichzeitig finden eine Kapazitation und anschließend die Akrosomreaktion statt. Alle in der Fachliteratur beschriebenen Untersuchungen zur Spermatozoen-Lipidbiosynthese wurden unter kapazitations- bzw. akrosomreaktionsfördernden Bedingungen *in-vitro* durchgeführt (Roldan and Shi, 2007).

Zusammenfassend haben die qualitativen Untersuchungen zur Fettsäurezusammensetzung porciner *Spermatozoen* gezeigt, dass die Octadecadiensäure in den Glycerophospholipiden porciner Spermatozoenlipide endogen vorhanden ist. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass eine Fettsäure, die endogen in GPL vorhanden ist, als Substrat für die Lipidsynthese verwendet wird. Die Fettsäuren in den neutralen Lipiden sind alle mittelkettige, und mit Ausnahme von 16:1, gesättigte Fettsäuren. Desweiteren lässt sich bei den intakten flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen* während der Lagerung bei 17°C keine aktive GPL-Lipidbiosynthese nachweisen.

### **4.3 Auswirkung der Fettsäuresupplementierung auf die Lipidzusammensetzung der Spermatozoen**

Die hier durchgeführten Untersuchungen der Lipide porciner *Spermatozoen* auf ihre Fettsäurezusammensetzung haben gezeigt, dass Octadecadiensäure in GPL vorkommt. In 1,2-DAG, der die Vorstufe bei der GPL Biosynthese fungiert, wurde hingegen keine Octadecadiensäure nachgewiesen (4.2). Daher wurde angenommen, dass eine Fettsäure, die endogen vorhanden ist, auch als Substrat für die Lipidbiosynthese akzeptiert wird. In der Literatur gibt es bereits Berichte, dass der Zusatz von Octadecadiensäure-BSA zum Kulturmedium einen positiven Effekt auf die Gefriertauglichkeit von *in vitro* Rinderembryonen hat. (Hochi et al., 1999). Die Zugabe dieser Säure zum Kulturmedium hat ebenfalls einen positiven Einfluss auf *in-vitro* Wachstum und Produktivität von *Chinese Hamster Ovary*-Zellen (CHO-Zellen) (Castro et al., 1995). Der metabolische Einbau exogener Octadecadiensäure in die Lipide porciner *Spermatozoen* ist *bis dato* in der Literatur nicht beschrieben. Die Zytotoxizität von freien Fettsäuren auf andere Zelltypen ist jedoch weitgehend bekannt (Di Paola and Lorusso, 2006; Di Paola et al., 2006; Qian and Eaton, 1994; Schonfeld and Wojtczak, 2008). Sowohl die Bedingungen als auch die einzusetzenden Konzentrationen von freien Fettsäuren für die chemische

Supplementierung porciner *Spermatozoen* sind jedoch unbekannt. Daher sollten zuerst die Supplementierungsbedingungen untersucht werden.

### **4.3.1 Analyse der Supplementierungsbedingungen für Octadecadiensäure**

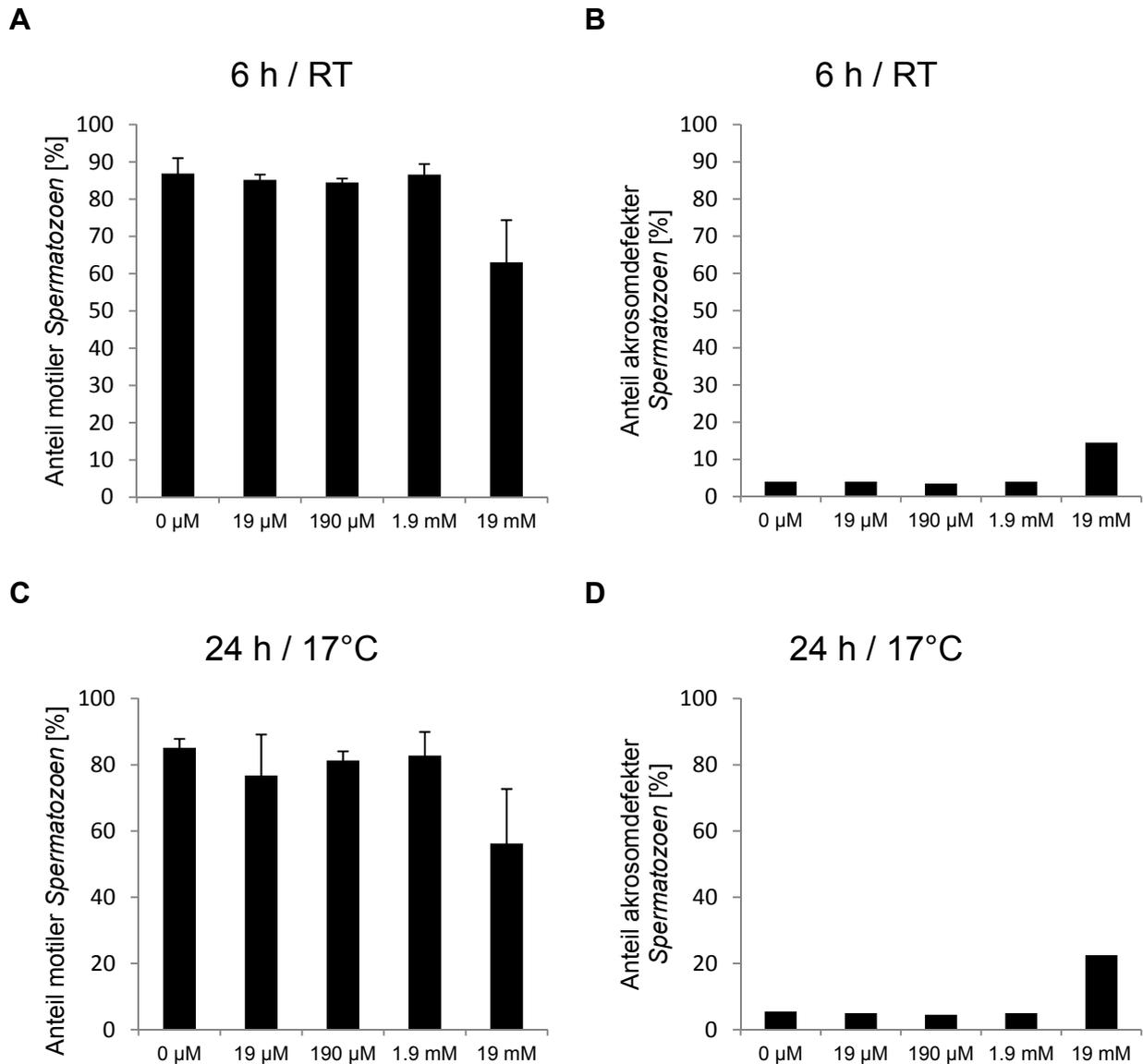
Bisher gib es kaum Berichte über die zytotoxische Wirkung von freien Fettsäuren auf *Spermatozoen*. Da sich die nachfolgenden Experimente mit dem Einbau von exogener Octadecadiensäure in die porcinen Spermatozoenlipide befassen, werden im folgenden Kapitel die Supplementierungsbedingungen ausschließlich für die Octadecadiensäure dargestellt. Es ist anzumerken, dass das „membranschädigende“ Potential der freien Fettsäuren nicht nur konzentrationsabhängig ist, sondern auch durch deren Sättigungsgrad sowie deren Kettenlänge beeinflusst werden kann (Oberle, 1999).

Freie Fettsäuren sind in organischen Lösungsmitteln gut löslich, in Wasser aber fast unlöslich. Ausführliche Informationen über die Löslichkeit einzelner Fettsäuren in Wasser sind in der Literatur bisher kaum vorhanden. In dieser Arbeit wurde mit lebenden Zellen unter physiologischen Bedingungen gearbeitet. Dies begrenzte die Auswahl der löslichkeitsvermittelnden Substanzen erheblich, da diese ebenfalls eine toxische Wirkung auf die porcinen *Spermatozoen* aufweisen können. In den Arbeiten von Hosek *et al.* (2010) an monozytären THP-1 Zellen wurde unter anderem gezeigt, dass Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsvermittler für freie Fettsäuren im Vergleich zu Rinderserumalbumin eine wesentlich höhere zytotoxische Wirkung besitzt. Für die nachfolgenden Experimente wurde daher auf die Verwendung von DMSO verzichtet und als lösungsvermittelnde Substanzen Ethanol und Rinderserumalbumin eingesetzt. Alle Komponenten des Supplementierungsmediums (Ethanol, Rinderserumalbumin, Octadecadiensäure) wurden einzeln auf ihre Toxizität untersucht (s. Material und Methoden, 3.5.5). In den folgenden Kapiteln wird der Begriff „Zytotoxizität“ vereinfachend sowohl für die negative Beeinflussung der Motilität als auch für die akrosomschädigenden Auswirkungen bestimmter Chemikalien auf die *Spermatozoen* verwendet.

#### **4.3.1.1 Zytotoxizität von Ethanol**

Bisher gib es in der Fachliteratur keine Berichte über die zytotoxische Wirkung von Ethanol auf porcine *Spermatozoen*. Dieses organische Lösungsmittel kann als

Lösungsvermittler für die freien Fettsäuren zugesetzt werden. Daher wurden zuerst unterschiedlichen Ethanol-Konzentrationen bezüglich ihrer toxischen Wirkung auf porcine *Spermatozoen* untersucht. Die ermittelten Werte der Zytotoxizitätsassays von Ethanol sind der Abbildung 15 zu entnehmen.



**Abbildung 15: Zytotoxizitätsassay nach Inkubation porciner Spermatozoen mit Ethanol**

Inkubationsdauer: 6 h bei RT; 24 h. bei 17°C

**A.** Anteil motiler *Spermatozoen* in [%]; nach 6 Std. bei RT **B.** Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* in [%] nach 6 Std. bei RT. **C.** Anteil motiler *Spermatozoen* nach 24 Std. bei 17°C. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen, sowie die Standardabweichung. Die Daten wurden mittels computerunterstützter Motilitätsanalyse (CASA) erhoben (3.5.3),  $n=1.000$  / Probe. **D.** Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* in [%] nach 24 Std. bei 17°C. Angegeben sind jeweils die Werte aus einfacher Bestimmung (3.5.2.2),  $n=200$  / Probe.

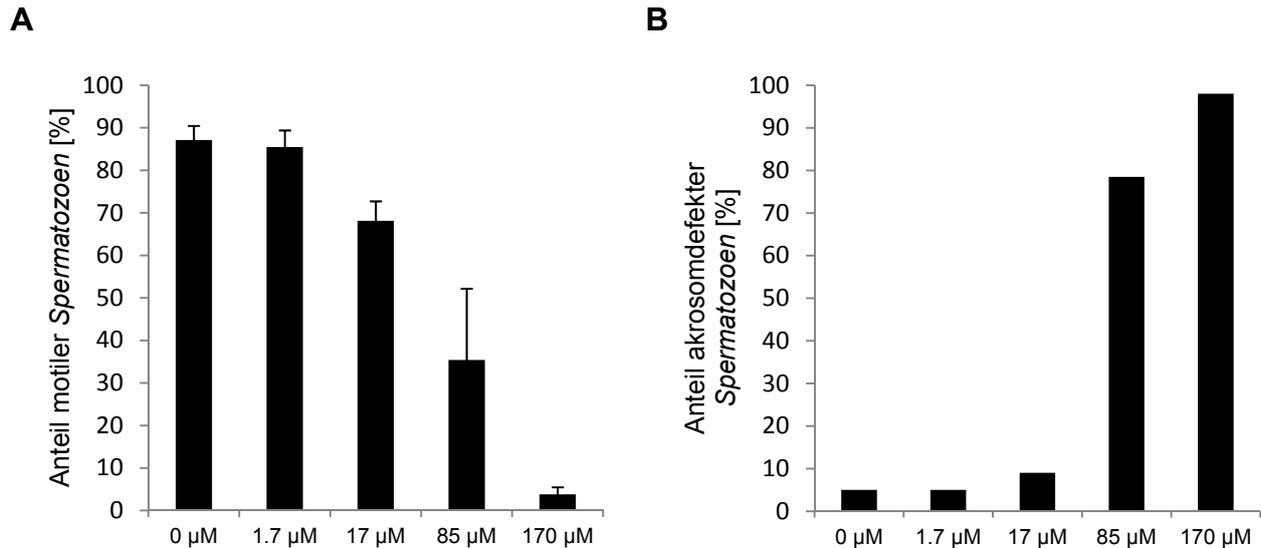
Alle untersuchten Ethanol-Konzentrationen zwischen 19 µM und 1.9 mM zeigen sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden Inkubation keine schädliche

Auswirkung auf die *Spermatozoen*. Bei der unbehandelten Kontrollprobe sind 87% der *Spermatozoen* motil und 4% akrosomdefekt. Bei einer Ethanol-Konzentration von 19 mM und einer Inkubationsdauer von 6 Stunden bei RT sinkt der Anteil motiler *Spermatozoen* verglichen mit der unbehandelten Kontrollprobe von 87% auf etwa 60%. Bei einer Verlängerung der Inkubationsdauer auf 24 Stunden und unter gleicher Ethanol-Anfangskonzentration von 19 mM sinkt die Motilität verglichen mit der unbehandelten Kontrollprobe von 85% auf 56%. Der Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* verglichen mit der unbehandelten Kontrollprobe steigt nach 6 Stunden Inkubation bei gleicher Ethanolanfangskonzentration von 4% auf 14% und dementsprechend nach der Inkubation von 24 Stunden auf 22% an.

Die Applikation von Ethanol führt bis zu einer Konzentration von 1.9 mM zu keinen nennenswerten zytotoxischen Auswirkungen auf die porcinen *Spermatozoen* und ist somit unbedenklich bezüglich der Beeinträchtigung der Motilität sowie dem Auftreten von Akrosomdefekten.

#### **4.3.1.2 Zytotoxizität von Rinderserumalbumin**

Serumalbumin wird routinemäßig als ein Lösungsvermittler für lipophile Substanzen benutzt (Hosek *et al.*, 2010; Imahori *et al.*, 1995). Es wird unter anderem auch als proteinhaltiges Kapazitationsmedium zum Auslösen der Akrosomreaktion *in-vitro* verwendet (Go and Wolf, 1985). Es liegen keine Berichte über die konzentrationsabhängige toxische Wirkung von fettsäurefreiem Rinderserumalbumin auf die *Spermatozoen* vor. Daher wurde dies bezüglich seiner zytotoxischen Wirkung bei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Die Herstellerangaben (A-7030, Sigma) zum Fettsäuregehalt (< 0.02%) des Rinderserumalbumins wurden mittels säurekatalysierter Transmethylierung und anschließender GC-Analyse verifiziert (Daten sind nicht gezeigt).



**Abbildung 16: Zytotoxizitätsassay nach Inkubation porciner *Spermatozoen* mit fettsäurefreiem Rinderserumalbumin**

Inkubationsdauer: 6 h bei RT;

**A.** Anteil motiler *Spermatozoen* in [%]. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen sowie die Standardabweichung. Die Daten wurden mittels computerunterstützter Motilitätsanalyse (CASA) erhoben (3.5.3),  $n=1.000$  / Probe.

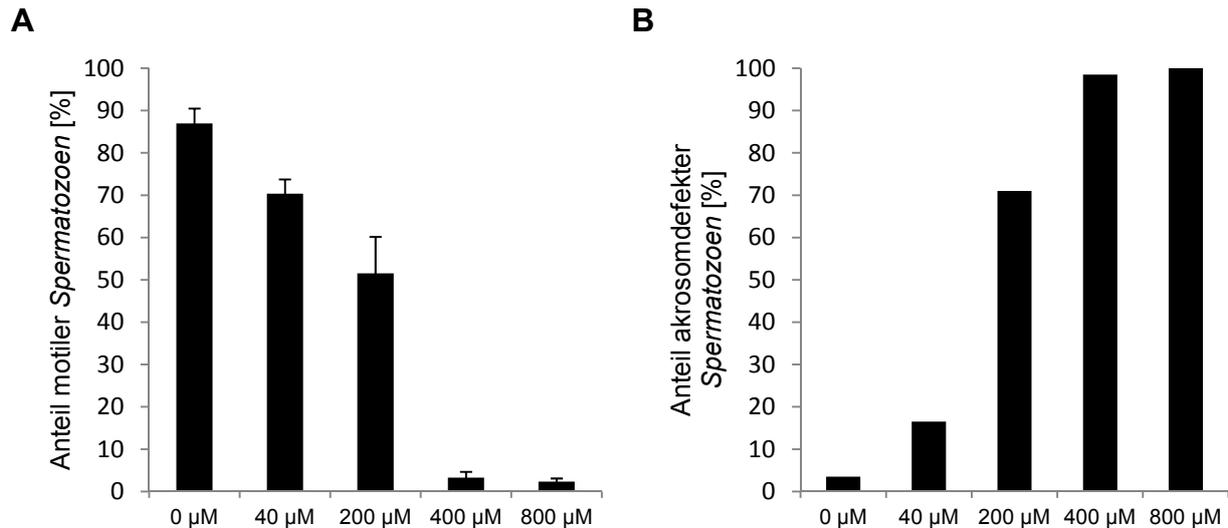
**B.** Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* in [%]. Angegeben sind die Werte aus einfacher Bestimmung, (3.5.2.2),  $n=200$  / Probe.

Aus den ermittelten Werten des Zytotoxizitätsassays von Rinderserumalbumin mit porcinen *Spermatozoen* geht hervor, dass nach 6 Stunden Inkubation bei RT mit einer Rinderserumalbumin-Konzentration von 1,7 µM keine Auswirkungen auf die Motilität und den akrosomalen Status der *Spermatozoen* zu verzeichnen ist (Abb. 16). Ab einer Konzentration von 17 µM ist ein Rückgang der Motilität von 85% auf 70% verglichen mit der unbehandelten Kontrollprobe zu verzeichnen. Der Anteil der akrosomdefekten *Spermatozoen* steigt unter den oben genannten Bedingungen von 5% auf 9% an. Ab einer Rinderserumalbumin-Anfangskonzentration von 85 µM sinkt der Anteil motiler *Spermatozoen* deutlich von 85% auf unter 50%. Der Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* liegt dann weit über 75%.

Bei einer Rinderserumalbumin-Anfangskonzentration von 170 µM wurden nahezu keine motilen *Spermatozoen* mehr beobachtet. Daher wurde für die nachfolgenden Experimente festgelegt, dass die maximale Konzentration von fettsäurefreiem Rinderserumalbumin eine Konzentration von 17 µM nicht übersteigen darf.

#### 4.3.1.3 Zytotoxizität von Octadecadiensäure

Für die Markierungs- sowie Supplementierungsexperimente bei den porcinen *Spermatozoen* mit Octadecadiensäure sollte diese in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und bezüglich ihrer zytotoxischen Auswirkungen untersucht werden. Für die Überprüfung der Zytotoxizität wurde die Octadecadiensäure mit der zuvor ermittelten unbedenklichen Ethanol-Menge versetzt und den porcinen *Spermatozoen* zugegeben (4.3.1.1).



**Abbildung 17: Zytotoxizitätsassay nach Inkubation porciner *Spermatozoen* mit Octadecadiensäure**

Inkubationsdauer: 6 h. bei RT; Konzentration von Octadecadiensäure;

**A.** Anteil motiler *Spermatozoen* in [%]. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen, sowie die Standardabweichung. Die Daten wurden mittels computerunterstützter Motilitätsanalyse (CASA) erhoben (3.5.3),  $n=1.000$  / Probe.

**B.** Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* in [%]. Angegeben sind die Werte aus einfacher Bestimmung (3.5.2.2),  $n=200$  / Probe.

Octadecadiensäure wurde mit Ethanol (1,9 mM) versetzt und den *Spermatozoen* in den angegebenen Konzentrationen zugegeben.

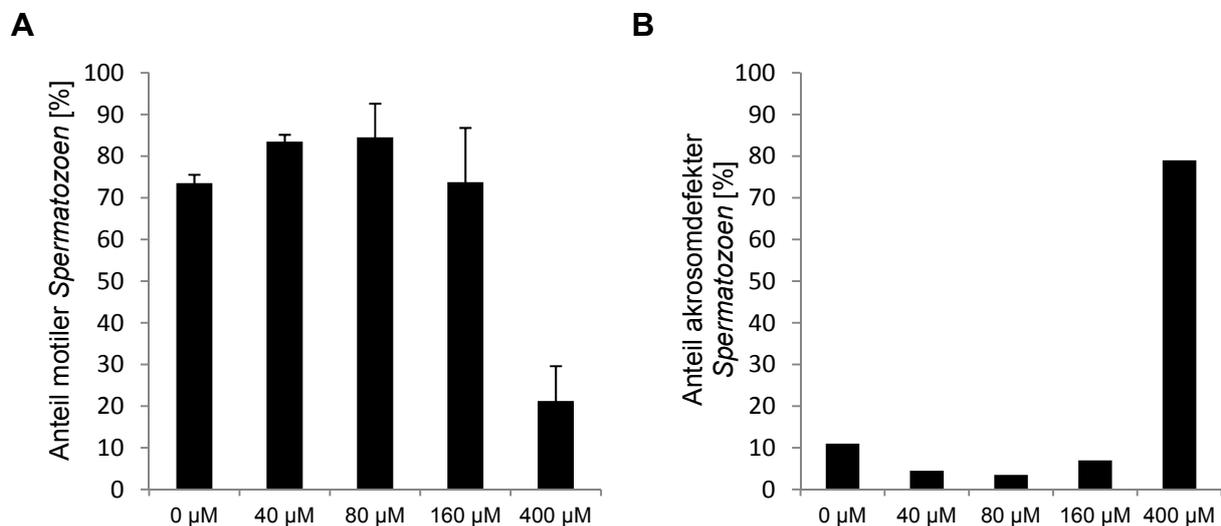
Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, sinkt die Motilität der *Spermatozoen* bereits nach 6 Stunden Inkubation im BTS-Medium bei einer 40 µM Octadecadiensäure-Anfangskonzentration von 86% bei der unbehandelten Kontrollprobe auf 70% ab. Die Octadecadiensäure ist bereits bei einer Konzentration von 200 µM stark zytotoxisch. Die Anzahl motiler *Spermatozoen* verringert sich hierbei von 85% auf unter 60% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* beträgt 71% verglichen mit nur 3% in der unbehandelten Kontrollprobe. Ab einer Konzentration von 400 µM konnten nahezu keine motilen sowie akrosomintakten mehr *Spermatozoen* beobachtet werden (Abb. 17). Für die nachfolgenden

Experimente wurde daher festgelegt, dass die maximale Anfangskonzentration der Octadecadiensäure lediglich 40  $\mu\text{M}$  betragen darf.

#### 4.3.1.4 Zytotoxizität von Octadecadiensäure unter Bedingungen einer Protein-vermittelten Verabreichung

In den vorangegangenen Experimenten wurden die einzelnen Komponenten des Supplementierungsmediums bezüglich ihrer Zytotoxizität untersucht und die jeweils maximal einzusetzende Stoffmenge festgelegt.

Hosek *et al.* (2010) untersuchten die Bioverfügbarkeit sowie die zytotoxischen Auswirkungen der Fettsäuresupplementierung bei THP-1 Zellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus freien Fettsäuren, Lösungsmittel sowie Rinderserumalbumin sowohl zu einer deutlich niedrigen Zytotoxizität des Lösungsmittels als auch zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit der freien Fettsäuren führt. Um einerseits die zytotoxischen Effekte zu minimieren und andererseits eine ausreichende Bioverfügbarkeit zu gewährleisten, wurde für die nachfolgenden Supplementierungs- und Markierungs-Experimente in ähnlicher Weise eine Protein-vermittelte Verabreichung der Fettsäuren zu den porcinen *Spermatozoen* durchgeführt.



**Abbildung 18: Zytotoxizität von Octadecadiensäure unter einer Protein-vermittelten Verabreichung**

Inkubationsdauer: 6 Std. bei RT

**A.** Anteil motiler *Spermatozoen* in [%]. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen, sowie die Standardabweichung. Die Daten wurden mittels computerunterstützter Motilitätsanalyse (CASA) erhoben (3.5.3),  $n=1.000$  / Probe.

**B.** Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* in [%]. Angegeben sind die Werte aus einfacher Bestimmung (3.5.2.2),  $n=200$  / Probe.

Die Konzentrationen der zu supplementierenden Substanzen:

Rinderserumalbumin 17  $\mu\text{M}$ ; Ethanol 1,9 mM.

Bis zur einer Konzentration der Octadecadiensäure von 160  $\mu\text{M}$  (mit Rinderserumalbumin 17  $\mu\text{M}$ , Ethanol 1,9 mM) konnte keine wesentliche Beeinträchtigung der Motilität als auch des Akrosoms der porcinen *Spermatozoen* festgestellt werden.

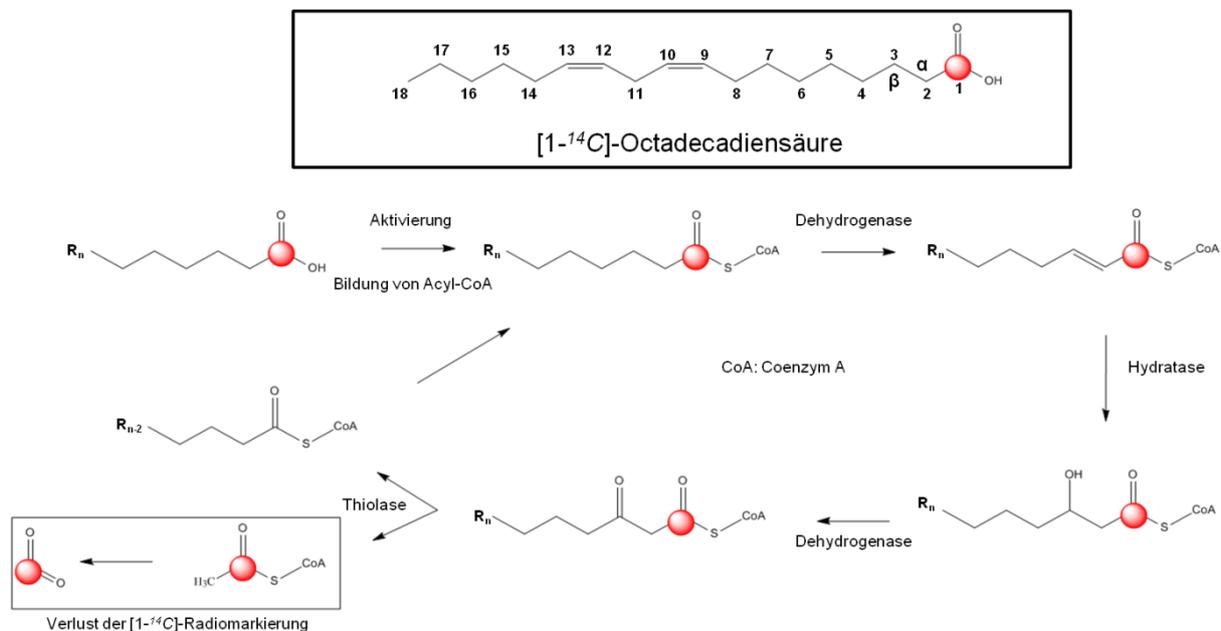
Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit gezeigt, dass die Applikation von Ethanol bis zu einer Konzentration von 1,9 mM zu keiner Beeinträchtigung der Motilität sowie zu keiner Akrosomschädigung porciner *Spermatozoen* führt. Die unbedenkliche Menge von fettsäurefreiem Rinderserumalbumin lag im Bereich zwischen 1,7 und 17  $\mu\text{M}$ . Für die kombinierte Applikation von in Ethanol gelöster Octadecadiensäure konnte keine maximal-duldbare Konzentration festgestellt werden. Für die nachfolgenden Markierungs- sowie Supplementierungsexperimente wurden die optimalen Konzentrationen aller Komponenten des Supplementierungsmediums festgelegt. Sie betragen für Rinderserumalbumin 17  $\mu\text{M}$ , für Ethanol 1,9 mM und für Octadecadiensäure 40  $\mu\text{M}$ . Alle hier genannten Werte beziehen sich auf die Anfangskonzentrationen.

### **4.3.2 Untersuchungen der bakteriellen Metabolisierung von [1-<sup>14</sup>C]- Octadecadiensäure**

Nach der Gewinnung lassen sich in jedem Ejakulat auch Bakterien, vor allem gramnegative Stämme, nachweisen (Okazaki *et al.*, 2010). Bakterien sind in der Lage, Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufzunehmen und zu verwerten (Black and DiRusso, 1994; Hou, 1994, 2000; Hou *et al.*, 1997). Die aufgenommenen Fettsäuren werden entweder bei Ressourcenmangel als Energiequelle genutzt oder metabolisch in die bakteriellen Membranlipide eingebaut. Die nachfolgenden Experimente beschäftigen sich mit dem Einbau exogener Octadecadiensäure in porcine Spermatozoenlipide. Liegt eine bakterielle Kontamination des Ejakulats vor, kann radioaktiv-markierte Octadecadiensäure sowohl von den *Spermatozoen* als auch von den Bakterien als Energiequelle bzw. Substrat für die Lipidbiosynthese verwendet werden. Aufgrund der zunehmenden Multiresistenz der Bakterien konnte trotz des Zusatzes von Antibiotika zum Flüssigkonservierungsmedium keine Keimfreiheit der untersuchten Proben gewährleistet werden. In diesem Fall enthält der Gesamtlipidextrakt sowohl Spermatozoen- als auch bakterielle Lipide. Bei der radiochemischen Auswertung dieser Lipide kann daher ihr metabolischer Ursprung

weder den *Spermatozoen* noch den Bakterien eindeutig zugeordnet werden. Daher wurde zuerst die bakterielle Metabolisierung von  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure ausführlicher untersucht (3.1).

Bakterien sind in der Lage Fettsäuren aufzunehmen und unter anderem durch  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Oxidation zu verwerten (Imamura *et al.*, 1990; Ishikawa *et al.*, 1997; Matsunaga *et al.*, 2000). Nach der Aufnahme und CoA-Aktivierung kommt es im Zuge der Oxidation zu einer Kettenverkürzung der Fettsäuren (Schulz, 2004; Wang and Schulz, 1989). Die Quelle der  $\beta$ -Strahlung der bei den nachfolgenden Experimenten verwendeten Radiochemikalie ist ein  $^{14}\text{C}$ -Atom an der C-1 Position der Fettsäure. Daher kommt es während der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Oxidation zu einem Verlust des radioaktiven  $[1-^{14}\text{C}]$ -Atoms (Abbildung 19).



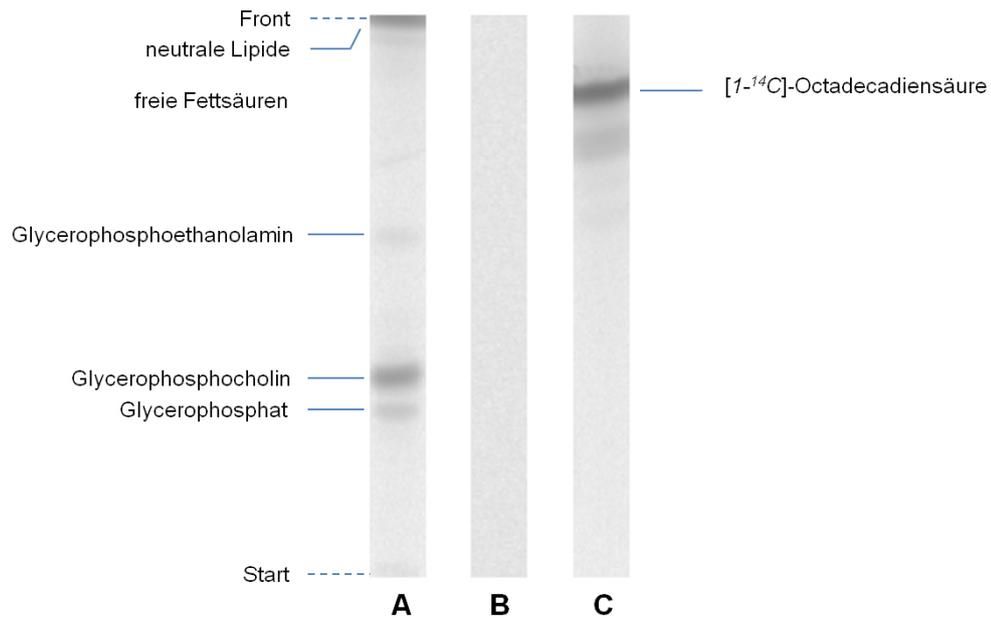
**Abbildung 19: Chemische Struktur der  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure und  $\beta$ -oxidativer Abbau von Fettsäuren.**

**Oben:**  $[1-^{14}\text{C}]$  Octadecadiensäure, das  $^{14}\text{C}$ -Atom ist in der C-1 Position der Fettsäure (rot dargestellt) lokalisiert.

**Unten:** Eine stark vereinfachte Darstellung vom  $\beta$ -oxidativen Abbau von Fettsäuren. Durch die Fettsäureoxidation wird das  $[1-^{14}\text{C}]$ -Atom abgespalten und somit kann unter Umständen ein „Blindabbau des Substrates“ während der Markierungsexperimente erfolgen. Die an den Reaktionen beteiligten enzymatischen Reaktionen sind ebenfalls vereinfacht dargestellt. Die  $\beta$ -Oxidation von ungesättigten Fettsäuren (z.B. Octadecadiensäure) entspricht der oben gezeigten Grundreaktion, einschließlich des Aktivierungsvorganges. Aufgrund der im Molekül enthaltenen Doppelbindungen (9Z,12Z) werden zum Abbau jedoch zusätzliche Enzyme (Dehydrogenase, Reduktase, Isomerase) benötigt (Schulz, 2004; Wang and Schulz, 1989). Fettsäuren, die an mehreren C-Atomen radioaktiv markiert sind (Tran and Christophersen, 2002), standen im Rahmen dieser Arbeit aus Kostengründen nicht zu Verfügung.

Unter diesen Bedingungen könnten auch die im Ejakulat vorkommenden Bakterien Fettsäuren als Energiequelle nutzen. In Glukose-freien Flüssigkonservierungsmedien können humane *Spermatozoen* ebenfalls Fettsäuren als Energiequelle nutzen (Lenzi *et al.*, 1996). Wenn die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Fettsäureoxidation stattfindet, wird das  $[1-^{14}\text{C}]$ -Atom von der in diesem Experiment eingesetzten Radiochemikalie abgespalten und es erfolgt somit ein „Blindabbau des Substrates“.

Für die nachfolgenden Markierungsexperimente wurden daher die Markierungsbedingungen und der Blindabbau der Radiochemikalie näher untersucht. Dazu wurden zwei porcine Spermatozoenproben (10 ml,  $0,2 \times 10^9$ ) durch den Austausch des BTS-Mediums auf gleiches Volumen des *p-NaCl*-Mediums zum Glukose-Mangel (1 h, RT) gebracht und nach unterschiedlicher Inkubationsdauer mit  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure markiert. Bei der Probe A fand die Markierung unmittelbar nach der einstündigen Inkubation statt. Die Dauer der Markierung mit  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure betrug 24 Stunden und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die eingesetzte Aktivität der Radiochemikalie betrug 0,25  $\mu\text{Ci}$ . Die Probe B wurde zuerst 72 Stunden lang bei RT inkubiert und dann mikroskopisch untersucht. Die nachfolgende radioaktive Markierung erfolgte wie bei Probe A. Die mikroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, dass nach 72 Stunden keine motilen *Spermatozoen* mehr beobachtet werden konnten. Sie lagen hingegen als Agglutinate vor und waren avital (Daten sind hier nicht gezeigt). Die bakterielle Kontamination der Probe war ebenfalls deutlich zu erkennen, welche anschließend zytochemisch untersucht wurde (3.11.2). Hierbei wurde eine starke Kontamination mit *Proteus mirabilis* und vereinzelt auch mit *Alcaligenes faecalis* nachgewiesen. Die bakteriologischen Kontrolluntersuchungen der verwendeten Flüssigkonservierungsmedien BTS- und *p-NaCl*-Medium wiesen hingegen keine bakterielle Kontamination auf. Somit konnte die Herkunft der Bakterien eindeutig den porcinen Ejakulaten zugeordnet werden. Nach dem positiven bakteriologischen Befund der Probe B wurde diese zur Kontrolle der bakteriellen Metabolisierung ebenfalls wie Probe A radioaktiv markiert. Nach Ende der Markierungszeit wurden aus beiden Proben die Gesamtlipide extrahiert, über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und anschließend autoradiographiert. Die Autoradiogramme sind in Abbildung 20 dargestellt.



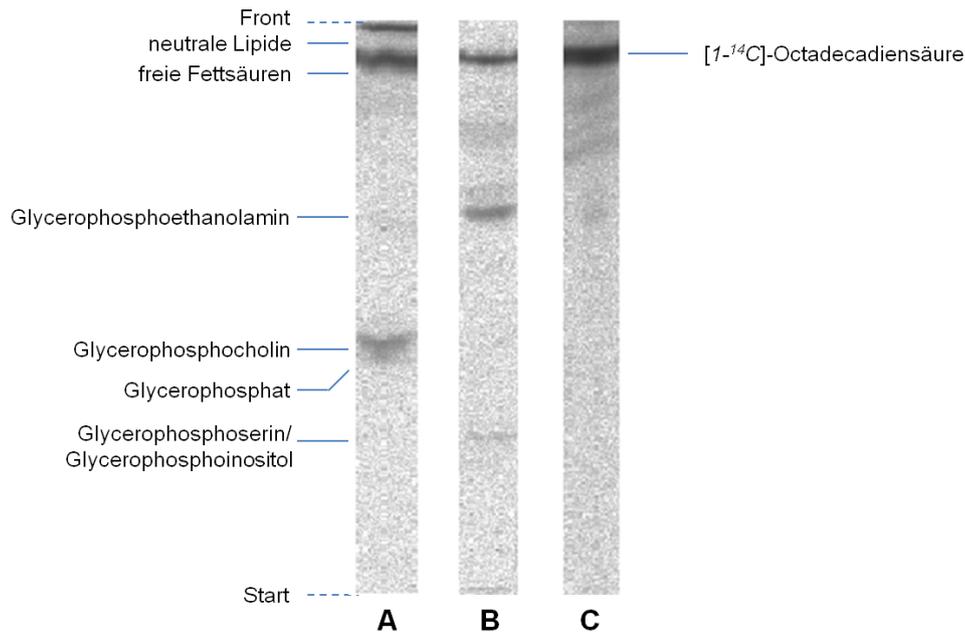
**Abbildung 20: Metabolischer Einbau der [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in die Lipide vitaler porciner Spermatozoen und bakterielle Metabolisierung in Glukose-freiem Medium**

**A.** vitale porcine Spermatozoen; **B.** bakterielle Kontamination des Ejakulates, avitale porcine Spermatozoen **C.** [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure;

Die Proben wurden 24 h bei RT mit [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure inkubiert. Anschließend fand die Gesamtlipidextraktion statt. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Gesamtlipidextrakte erfolgte in Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O (65:25:4). Es sind Autoradiogramme dargestellt. Die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen erfolgte anhand der R<sub>F</sub>-Werte von Referenzsubstanzen.

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, konnte keine freie [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure im Gesamtlipidextrakt der beiden untersuchten Proben nachgewiesen werden. Bei den vitalen Spermatozoen lässt sich der metabolische Einbau der Radiochemikalie sowohl bei den polaren als auch bei den neutralen Lipiden detektieren (Abb. 20, A). Dies deutet darauf hin, dass unter diesen Bedingungen eine vollständige metabolische Aufnahme mit anschließendem Einbau der Radiochemikalie in die Spermatozoenlipiden stattgefunden hat. Bei den avitalen Spermatozoen, die eine hohe bakterielle Kontamination aufwiesen, ließ sich hingegen kein radioaktives Signal detektieren (Abb. 20, B). Dies deutet darauf hin, dass nur die vitalen Spermatozoen zu einer metabolischen Fettsäureaufnahme und Metabolisierung der exogenen Fettsäuren befähigt sind. Durch die vollständige Abwesenheit der radioaktiv markierten Lipide in Probe B, kann angenommen werden, dass durch den bakteriellen Stoffwechsel in Glukose-freiem Medium ein „Blindabbau des Substrates“ (<sup>14</sup>C-Atom an der C-1 Position der Fettsäure) stattgefunden hat.

Das Experiment wurde mit Glukose-haltigem BTS-Medium wiederholt. Die eingesetzten Mengen der Radiochemikalie, das Volumen der Proben sowie die Zellzahlen der *Spermatozoen* entsprachen dem vorherigen Experiment. In Abbildung 21 sind die Autoradiogramme dargestellt. In diesem Experiment erfolgte der Einbau der Radiochemikalie sowohl in die Spermatozoenlipide als auch in die Bakterienlipide.



**Abbildung 21: Metabolischer Einbau der  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure in die Lipide vitaler porciner *Spermatozoen* und bakterielle Metabolisierung in Glukose-haltigem Medium**

**A.** vitale porcine *Spermatozoen*; **B.** bakterielle Kontamination des Ejakulates, avitale porcine *Spermatozoen* **C.**  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure;

Die Proben wurden 24 h bei RT mit  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure inkubiert. Anschließend fand die Lipidextraktion statt. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Gesamtlipidextrakte erfolgte in Chloroform / Methanol /  $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4). Es sind Autoradiogramme dargestellt. Die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen erfolgte anhand der  $R_f$ -Werte von Referenzsubstanzen.

Bei beiden untersuchten Proben wurde im Gesamtlipidextrakt freie  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass im Glukose-haltigen Medium eine unvollständige metabolische Aufnahme mit anschließendem Einbau der Radiochemikalie sowohl in die Spermatozoen- als auch in die Bakterien-Lipide stattgefunden hat. Bei den vitalen *Spermatozoen* wurde der metabolische Einbau der Radiochemikalie sowohl bei den polaren als auch bei den neutralen Lipiden detektiert (Abb. 21, A). Anhand der Referenzsubstanzen konnte das radioaktive polare Lipid als Glycerophosphocholin (GPC) identifiziert werden. Bei der Probe mit avitalen porcine *Spermatozoen* und bakteriellen Komponenten ließ sich der

metabolische Einbau der Radiochemikalie nur in die polaren Lipide nachweisen (Abb. 21, B). Als Hauptvertreter wurde Glycerophosphoethanolamin (GPE) identifiziert. GPS / GPI kommen in wesentlich geringeren Mengen vor und wurden daher in den nachfolgenden Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt (4.3.3). Der metabolische Einbau von [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure in GPE konnte bei vitalen *Spermatozoen* nicht nachgewiesen werden. Die Herkunft der radioaktiven Lipide konnte somit eindeutig entweder den porcinen *Spermatozoen* oder der bakteriellen Kontamination zugeordnet werden.

Die Abwesenheit des radioaktiven Signals auf der Frontlinie deutet darauf hin, dass es bei der bakteriellen Metabolisierung keine metabolische Einbau in die neutralen Lipide stattfindet. Daher kann eine *de-novo* Biosynthese von GPE / GPI via 1,2-DAG ausgeschlossen werden. Es kann angenommen werden, dass die metabolische Aufnahme der Radiochemikalie direkt in GPE / GPI erfolgte. Die Bakterien können die zu dem Kulturmedium zugesetzten exogene Fettsäuren in ihre bereits vorhandenen Phospholipide mittels bakterieller Acyltransferasen metabolisch aufnehmen (Fujita *et al.*, 2007; Zhang and Rock, 2008). Die Hauptvertreter der bakteriellen polaren Lipidklassen sind GPE und Glycerophosphoglycerol (GPG) und kommen sowohl bei gramnegativen als auch bei grampositiven Bakterien vor (Mazzella *et al.*, 2004; O'Leary and Wilkinson, 1988; Wilkinson, 1988). Bei den Mycobakterien wurden bereit sowohl GPE als auch GPI beschrieben (Morita *et al.*, 2011). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit und die Literaturangaben über den metabolischen Einbau von Fettsäuren in bakterielle Lipide zeigen somit, dass die metabolische Aufnahme der Radiochemikalie in GPC spermatozoenspezifisch und die Aufnahme in GPE / GPI bakterienspezifisch ist (4.3.3.).

In diesem Teil der Arbeit wurden die Voraussetzungen für die nachfolgenden Untersuchungen der metabolischen Aufnahme der exogenen Octadecadiensäure in porcine Spermatozoenlipide geschaffen. Zuerst wurden alle Supplementierungskomponenten einzeln auf ihre Zytotoxizität für porcine *Spermatozoen* überprüft. Dann wurden die Supplementierungsbedingungen wie die Fettsäurelöslichkeit und ihre Bioverfügbarkeit optimiert. Die anschließenden Experimente ermöglichten die exakte Zuordnung der metabolischen Aufnahme der Radiochemikalie entweder in die Lipide der porcinen *Spermatozoen* oder in Lipide

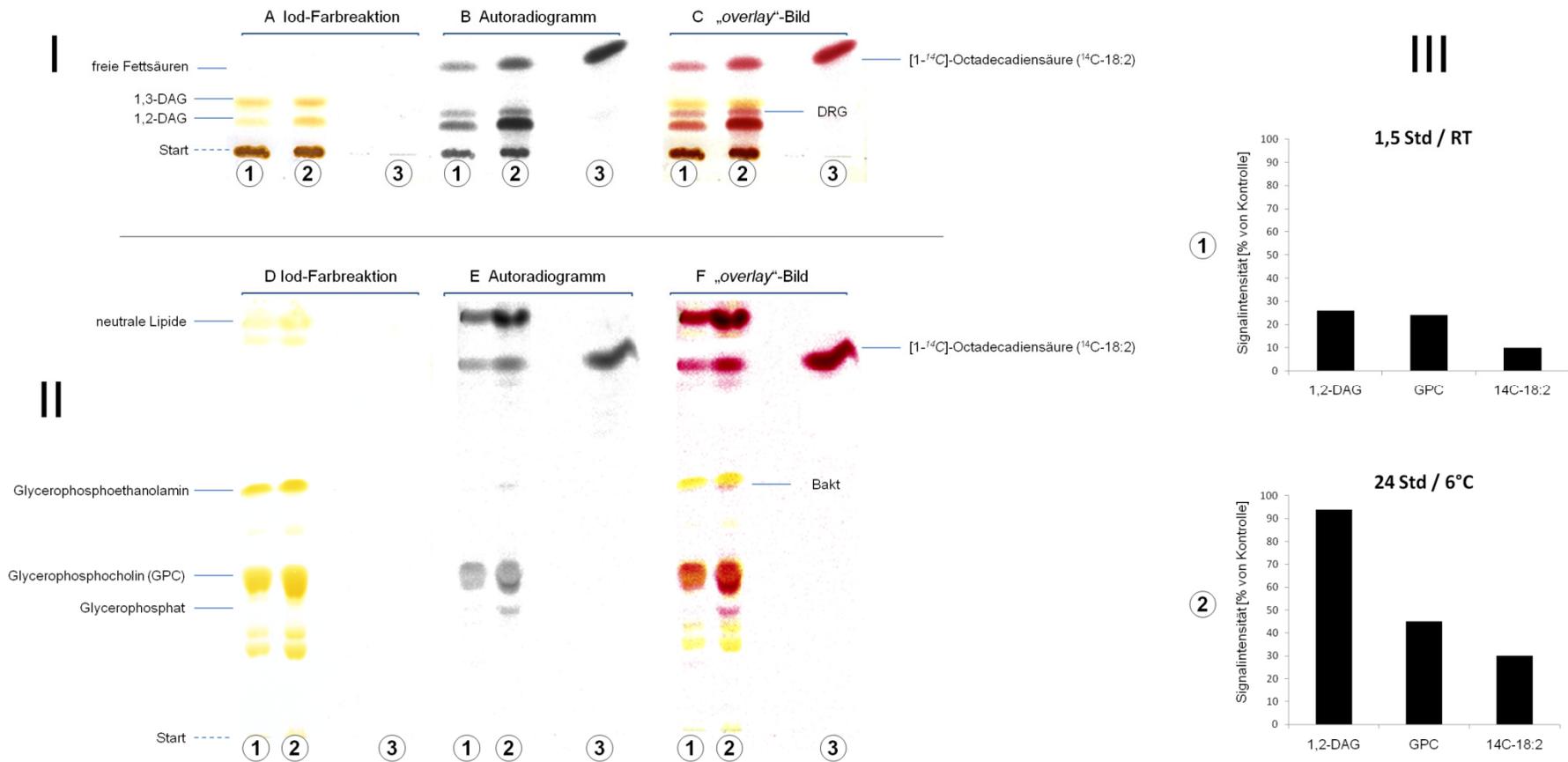
der bakteriellen Kontamination. Die hier ermittelten Ergebnisse und die zuvor analysierte Lipid- und Fettsäurezusammensetzung porciner *Spermatozoen* waren für die nachfolgenden Untersuchungen des metabolischen Einbaus exogener Octadecadiensäure in die Spermatozoenlipide unabdingbar.

### **4.3.3 Einbau der [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in porcine Spermatozoenlipide**

Ein Weg zur Aufklärung des metabolischen Einbaus chemisch supplementierter Octadecadiensäure in porcine Spermatozoenlipide sind die Markierungsexperimente mit radioaktiv markierten Fettsäuren. Auf diese Weise konnten wichtige Erkenntnisse zur Biosynthese der Lipide gewonnen werden. Dazu wurden vergleichende Experimente mit [1-<sup>14</sup>C]-Isotopen von Octadecadiensäure durchgeführt. Die porcinen *Spermatozoen* wurden in BTS-Medium aufgenommen (3.4) und mit einem Gemisch bestehend aus [<sup>12</sup>C]- und [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure markiert (3.9.1). Die Endkonzentration des Isotopengemisches betrug 39 µM. Nach der jeweiligen Inkubationsperiode wurden die Zellen gewaschen und die Lipide extrahiert (3.6.1). Danach erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie die Auftrennung polarer und neutraler Lipide (3.6.2). Anschließend wurden die Platten autoradiographiert (3.9.4) und radioaktive Lipide mit Hilfe von Referenzlipiden den jeweiligen Lipidklassen zugeordnet (3.9.5) und densitometrisch quantifiziert (3.9.7). Die genauen eingesetzten Isotopmengen, die Dauer der Markierung, die Temperaturbedingungen sowie die Versuchsparameter der Dünnschichtchromatographie sind dem jeweiligen Experiment zu entnehmen.

Für die Untersuchungen des metabolischen Einbaus von Octadecadiensäure wurden  $1.33 \times 10^9$  porcine *Spermatozoen* in 60 ml BTS-Medium mit dem [<sup>12</sup>C] / [1-<sup>14</sup>C] Isotopengemisch für 1,5 Stunden bei RT (Probe ①) und 24 Stunden bei 6°C (Probe ②) markiert. Die eingesetzte Aktivität wurde bei jeder Inkubationsvariante auf 4,3 µCi eingestellt. Anschließend wurden die Proben durch Waschen von den nicht metabolisierten Radiochemikalien befreit. Die Lipide wurden dann extrahiert und über Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Zur Analyse des metabolischen Einbaus der Radiochemikalie wurden nun die DC-Platten autoradiographiert. Sowohl die Lipidextraktion aus den *Spermatozoen*, als auch die dünnschichtchromatographische Auftrennung fand für beide Proben unter gleichen Bedingungen statt. Die ermittelten Ergebnisse sind in der Abbildung 22 dargestellt.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 22: Dünnschichtchromatographische Auftrennung porciner Spermatozoenlipide und densitometrische Quantifizierung der Radiosignale nach Markierung mit [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure**

**Probe ①:** Markierungsdauer 1,5 Std bei RT; **Probe ②:** Markierungsdauer 24 Std bei 6°C; **Probe ③:** [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure

**A, D:** DC-Platte, Iod-Farbreaktion; **B, E:** Autoradiogramm; **C, F:** „Overlay“-Bild: Iod-Farbreaktion und Autoradiogramm. Das Radiosignal ist rot dargestellt.

**I. Neutrale Lipide:** Die Auftrennung erfolgte in *n*-Hexan / Diethylether / Eisessig (80:15:1);

**II. Polare Lipide:** Die Auftrennung erfolgte in Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O (65:25:4);

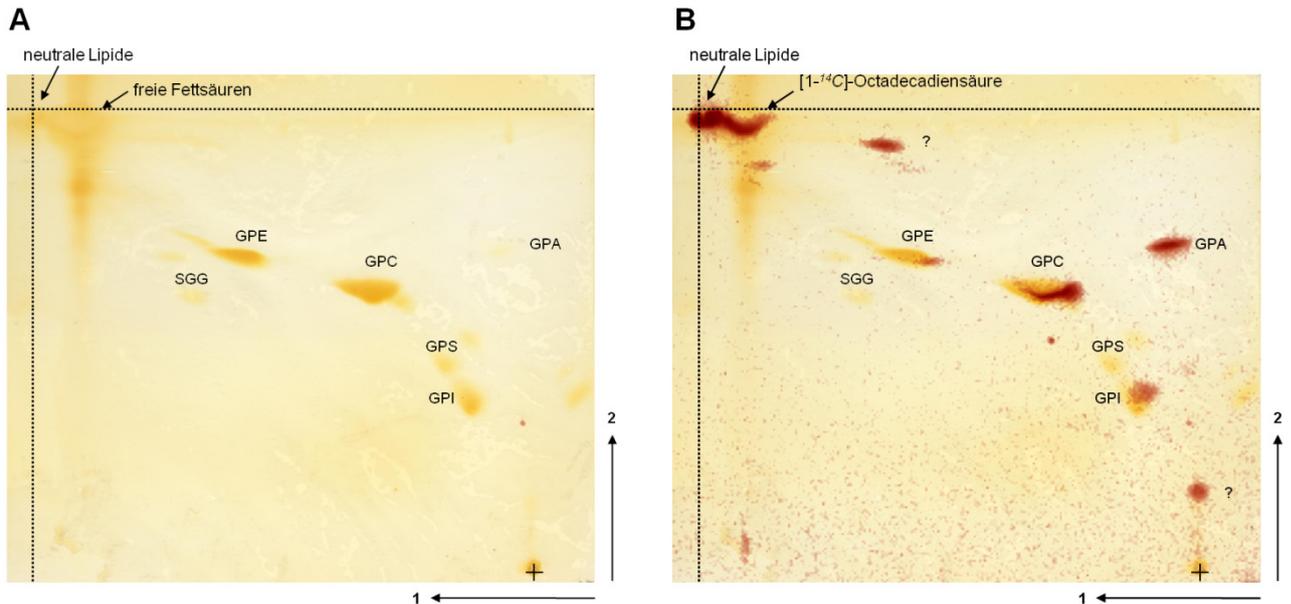
**III. Densitometrische Quantifizierung:** Der metabolische Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure erfolgte in 1,2-DAG und GPC.

Die Auftrennung des Gesamtlipidextraktes erfolgte jeweils auf DC-Platten: SI<sub>250</sub> PA 7000-04, J.T. Baker;

Die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen erfolgte anhand von Referenzsubstanzen und den *R<sub>F</sub>*-Werten der Lipidklassen.

Bakt: der metabolische Einbau in bakterielles GPE (s. 4.3.1.4); DRG: der metabolische Einbau in Diradylglycerol.

Für die nachfolgende Auswertung werden nur Lipide berücksichtigt, in die der metabolische Einbau der  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure erfolgte. Bei Probe ① fand bereits nach 1,5 Std Inkubation bei RT eine unvollständige metabolische Aufnahme mit anschließendem Einbau der Radiochemikalie sowohl in die polaren als auch in die neutralen Lipide statt. Anhand der Referenzsubstanzen konnte das radioaktive polare Lipid als Glycerophosphocholin (GPC) und das radioaktive neutrale Lipid als 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG) identifiziert werden. Da die weiteren radioaktiv markierten Lipide durch eine wesentlich geringere Intensität gekennzeichnet sind, werden diese im Folgenden nicht mehr berücksichtigt. Die relative densitometrische Quantifizierung der metabolisch eingebauten Radiochemikalie in Probe 1 weist für GPC und 1,2-DAG eine annähernd gleiche Intensität auf (Abb. 22, III-1). Bei Probe ② mit einer Inkubationsdauer von 24 Std bei 6°C ist die Gesamtintensität von GPC, 1,2-DAG und der von den *Spermatozoen* aufgenommenen freien Radiochemikalie deutlich erhöht. Die Signalstärke des markierten 1,2-DAG ist im Vergleich zum ebenfalls markierten GPC annähernd doppelt so hoch (Abb. 22, III-2). Im Autoradiogramm der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Gesamtlipidextraktes porciner *Spermatozoen* die mit  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure markiert wurden, migrierte ein unbekanntes Lipid zwischen 1,3- und 1,2-DAG (Abb. 22, I). Mittels nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen konnte dies Lipid als 1Z-alkenylacylglycerol (0-16:1 /  $[U-^{13}\text{C}]$ -18:2) identifiziert werden, welches in dieser Arbeit vereinfachend als Diracylglycerol (DRG) bezeichnet wird (4.3.5.2). Da kein radioaktiv markiertes in 1,3-DAG detektiert werden konnte, wurde eine spontane DAG-Isomerisierung während der DC-Auftrennung wie von Kodali *et al.* (1990) beschrieben, ausgeschlossen. Bei der Auswertung des Autoradiogramms von Probe ② ist eine deutliche Co-Migration des radioaktiven GPC innerhalb des GPC-Spots zu erkennen (Abb. 22, II-E). Da dies nicht homogen verteilt war, wurde zur genaueren Analyse des radioaktiven Signals innerhalb des GPC-Spots eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dazu wurden  $1 \times 10^9$  porcine *Spermatozoen* mit dem  $[^{12}\text{C}] / [1-^{14}\text{C}]$  Isotopengemisch in 45 ml BTS-Medium für 1,5 Std bei RT markiert. Das Isotopengemisch wurde mit einer Endkonzentration von 39  $\mu\text{M}$  bei einer Aktivität der Radiochemikalie von 3,2  $\mu\text{Ci}$  eingesetzt. Die ermittelten Ergebnisse sind in der Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23: 2D-dünnschichtchromatographische Auftrennung polarer Lipide porciner Spermatozoen nach Markierung mit [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure**

**A.** DC-Platte, Iod-Farbreaktion **B.** „Overlay“-Bild: Farbreaktion und Autoradiogramm. Radioaktive Signale sind rot markiert. Die Auftrennung erfolgte in **1.** Chloroform / Methanol / 25% NH<sub>4</sub>OH (90:54:7) **2.** Chloroform / Methanol / Aceton / Eisessig / H<sub>2</sub>O (50:10:20:10:5 bei 30°C).

**FFS:** freie Fettsäuren; **GPE:** Glycerophosphoethanolamin; **SGG:** Sulfogalactosylglycerolipid; **GPC:** Glycerophosphocholin; **GPS:** Glycerophosphoserin; **GPA:** Glycerophosphat; **GPI:** Glycerophosphoinositol, (?) – unbekanntes Lipid.

Markierungsbedingungen: 1,5 h, RT. Die Auftrennung erfolgte auf DC-Platten: SI<sub>250</sub> PA 7000-04, J.T. Baker. Die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen erfolgte anhand von Referenzsubstanzen und den *R<sub>F</sub>*-Werten der Lipidklassen (Weingartner *et al.*, 2010).

In der 2D-dünnschichtchromatographischen Analyse erfolgte eine genauere Auftrennung der polaren Lipide des Gesamtlipidextraktes porciner *Spermatozoen*. Die Laufeigenschaften von polaren Lipiden werden unter diesen experimentellen Bedingungen in erster Linie durch die Ladung der Kopfgruppe bestimmt. Die *acyl-*, *plasmanyl-* sowie *plasmenyl-* Reste von unterschiedlichen Lipidspezies einer Klasse haben eine deutlich geringere Auswirkung auf die Laufparameter (Fuchs *et al.*, 2011). Erst durch die 2D-dünnschichtchromatographische Analyse kann eine Co-Migration unterschiedlicher Lipidklassen ausgeschlossen werden.

Bei der Auswertung der Autoradiogramme der 2D-dünnschichtchromatographie ist eine inhomogene Verteilung des radioaktiven Signals innerhalb des GPC-Spots deutlich zu erkennen (Abb.23, B). Würde der Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in alle GPC-Klassen erfolgen, käme es zu einer homogenen Verteilung des Signals. In der Plasmamembran porciner *Spermatozoen* kommen die Glycerophosphocholine zu etwa 20% als *diacyl*-GPC und ungefähr zu 80% als Ether-GPC vor (Evans *et al.*, 1980). Anhand der Verteilung des radioaktiven Signals innerhalb des gesamten

GPC-Spots wird somit angenommen, dass ein metabolischer Einbau der Radiochemikalie nur in die *diacyl*-GPC erfolgte. Diese Annahme konnte durch die nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen verifiziert werden. Bei GPA, welches die Vorstufe der *de-novo* Biosynthese von GPC ist, war ebenfalls ein Einbau der Radiochemikalie zu beobachten. Sowohl bei GPE als auch bei GPI sind wesentlich geringere Intensitäten des radioaktiven Signals zu verzeichnen. Anhand der vorangegangenen Untersuchungen konnte der metabolische Einbau der Radiochemikalie in GPE / GPI ausschließlich der bakteriellen Kontamination zugeordnet werden (4.3.2). Somit lag hier eine geringfügige bakterielle Kontamination des Ejakulates vor. Der Einbau der Radiochemikalie in SGG und in GPS konnte nicht beobachtet werden. Dadurch konnte ihr metabolischer Einbau in diese Lipidklassen ausgeschlossen werden. Desweiteren migriert ein unbekanntes Lipid oberhalb des GPE-Spots und stellt wahrscheinlich ein azidisches Lysoprodukt von bakteriellem GPE dar. Die Entstehung derartiger Lysoprodukte wurde bereits ausführlich beschrieben (Arnhold *et al.*, 1995; Lessig *et al.*, 2007). Die Autoren geben an, dass bei Ether-GPL bereits sehr geringe Säure-Konzentrationen zur Hydrolyse der Vinyl-Ether-Bindung führen können. Bei GPC war unter diesen Bedingungen keine Entstehung von Lysoprodukten zu beobachten. Dies stärkt ebenfalls die Annahme, dass es sich bei dem radioaktiven GPC um *diacyl*-GPC handelt.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit der Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in die neutralen und polaren Lipide von porcinen *Spermatozoen* genauer untersucht. Anhand der densitometrischen Quantifizierung wurde der Einfluss der Temperatur und der Inkubationsdauer auf den metabolischen Einbau der [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure beobachtet. Mittels der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen konnten die neutralen Lipide als 1,2-Diacylglycerol und die polaren Lipide wahrscheinlich als *diacyl*-GPC charakterisiert werden. Zur ausführlicheren Analyse dieser Lipide wurden daher im Anschluss massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt.

#### 4.3.4 Untersuchung des Einbaus von [ $^{12}\text{C}$ ]-, [U- $^{13}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure in DAG mittels MALDI-TOF-MS

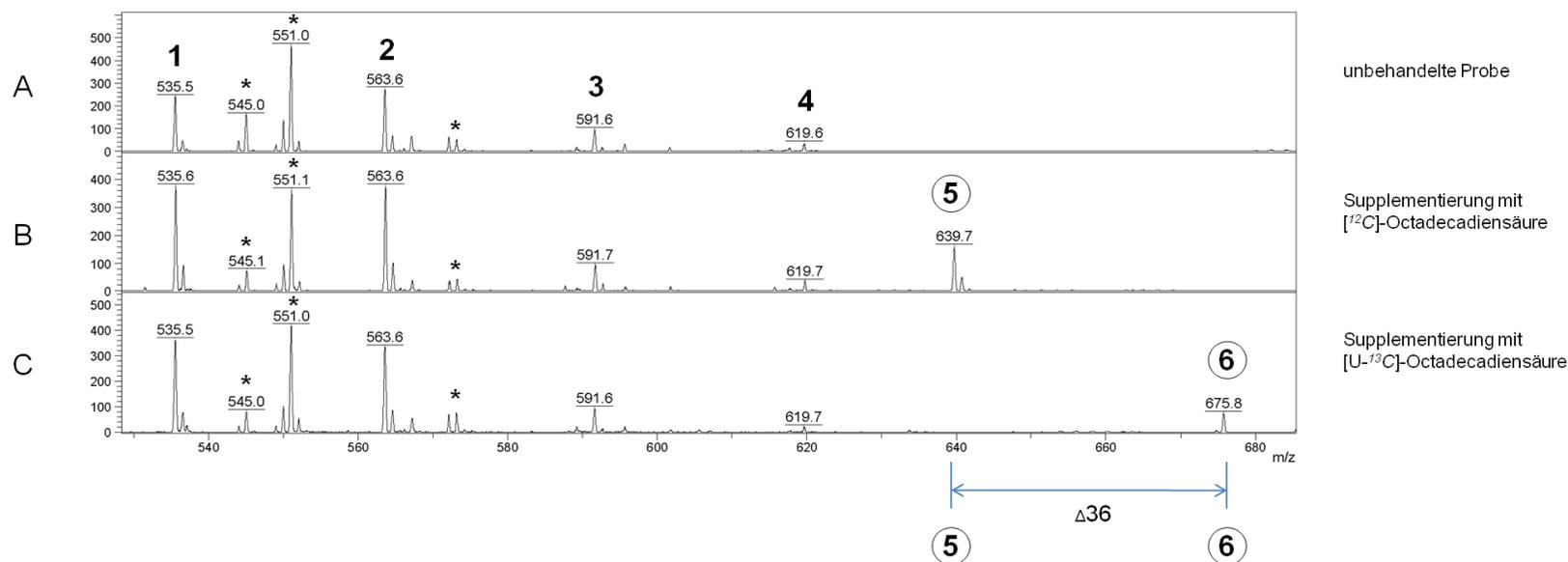
Anhand der Markierungsexperimente mit [U- $^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure wurde gezeigt, dass ihr metabolischer Einbau überwiegend in zwei unterschiedliche Lipidklassen (GPC und DAG) erfolgt. Das radioaktive Signal gibt nur einen Hinweis darauf, dass der metabolische Einbau stattgefunden hat. Es kann jedoch nicht differenziert werden, ob eine Elongation, Desaturation oder eine Oxidation der Radiochemikalie erfolgte. Bei der Auswertung der Autoradiogramme kann ebenfalls nicht bestimmt werden, ob nur ein oder zwei Moleküle [1- $^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure in DAG bzw. *diacyl*-GPC eingebaut wurden. So hat ein Molekül mit zwei metabolisch eingebauten [1- $^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäuren die gleiche radioaktive Signalintensität wie zwei Moleküle mit jeweils nur einer metabolisch eingebauten Radiochemikalie. Somit ist eine relative Quantifizierung der radioaktiven Lipidklassen zueinander anhand der Signalintensität nicht möglich.

In den Arbeiten von (Roldan and Fragio, 1994; Roldan and Harrison, 1990, 1992, 1993; Vazquez and Roldan, 1997a, b) wurden bisher nur die unterschiedlichen Lipidklassen für Säugetierspermatozoen radiochemisch unter akrosomreaktionsfördernden Bedingungen untersucht. Im Zuge der Akrosomreaktion werden unter anderen Lipasen aktiviert, die zu einer Abspaltung der Kopfgruppen bzw. Fettsäuren führen können (Roldan, 1998). Somit ist der Vergleich der Literaturangaben mit den hier durchgeführten Experimenten während der Flüssigkonservierung nur sehr eingeschränkt möglich. In der Fachliteratur liegt *bis dato* keine Information über Säugetierspermatozoenlipide vor, die erst nach einer chemischen Supplementierung mit exogenen Fettsäuren während der Flüssigkonservierung entstehen.

Bei den vorangegangenen gaschromatographischen Untersuchungen der Fettsäurezusammensetzung der Hauptlipidklassen porciner *Spermatozoen* wurde gezeigt, dass Octadecadiensäure in GPC aber nicht in den neutralen Lipiden vorkommt (4.2). Um die in GPC porciner *Spermatozoen* bereits endogen vorkommende [ $^{12}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure von der exogen chemisch supplementierten unterscheiden zu können, wurden vergleichende Experimente mit [ $^{12}\text{C}$ ]- sowie mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-Isotopen durchgeführt (3.10.1, 3.10.2). Anschließend wurden die Lipide

porciner *Spermatozoen* massenspektrometrisch untersucht. Dafür wurden eine Probe mit  $2 \times 10^9$  porcinen *Spermatozoen* in 90 ml BTS-Medium, mit [ $^{12}\text{C}$ ]- und eine weitere mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure für 48 Stunden bei 17°C supplementiert. Die jeweilige Fettsäure-Konzentration betrug 39  $\mu\text{M}$ , was einer Absolutmenge von 980  $\mu\text{g}$  entspricht. Nach der Gesamtlipidextraktion (3.6.1) wurden die neutralen Lipide über DC aufgetrennt (3.6.2), präparativ aufgereinigt und anschließend einer MALDI-TOF-MS-Untersuchung unterzogen (3.7.1). Bei positiver Ionendetektion und eingesetzter 2,5-DHB-Matrix lassen sich die neutralen Lipide (TRG / DRG / MRG) als  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ - und die polaren Lipide (GPC) in erster Linie als  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasimolekülonen darstellen (Gidden *et al.*, 2007; Schiller *et al.*, 2007). In der Abbildung 24 sind die MALDI-positiv-Ionen-Massenspektren der neutralen Lipide (DAG) bei den verschiedenen Supplementierungsvarianten dargestellt. Die Probe A ist die unbehandelte Kontrollprobe, Probe B wurde mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure und Probe C mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure supplementiert. Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, lassen sich in allen drei Massenspektren (Probe A, B, C) die den  $\text{Na}^+$ -Addukten entsprechenden Quasi-Molekülonen (Peak 1-4) mit  $m/z=535$ ,  $m/z=563$ ,  $m/z=591$  und  $m/z=619$  erkennen. Diese könnten entweder zu den  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  oder zu den  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Addukten der neutralen Lipiden zugeordnet werden. Sowohl in den eigenen Vorarbeiten, als auch in den Publikationen anderer Arbeitsgruppen (Gidden *et al.*, 2007) wurde jedoch gezeigt, dass bei der massenspektrometrischen Untersuchung von neutralen Lipiden mittels MALDI-TOF ganz überwiegend  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ - und nicht etwa  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Addukte gebildet werden. Daher konnten die detektierten Quasimolekülonen entsprechend DAG-28:0 bis DAG-34:0 zugeordnet werden (Tab. 8, Peak 1-4). Dies deutet darauf hin, dass in allen untersuchten Proben kurzkettige, gesättigte Fettsäuren für Diacylglycerol charakteristisch sind. Im Massenspektrum weisen die Signale von DAG 28:0 ( $m/z=535$ ) und DAG 30:0 ( $m/z=563$ ) die höchsten Intensitäten auf. Daher sind die 14:0- sowie 16:0-Fettsäuren die Hauptvertreter von DAG in porcinen *Spermatozoen*. Dies konnte bereits bei den gaschromatographischen Untersuchungen der Fettsäurezusammensetzung neutraler Lipide in Kapitel 4.1 gezeigt werden. Die 14:0-Fettsäure ist mit ca. 60 mol% und die 16:0-Fettsäure mit ca. 30 mol% in den neutralen Lipiden vertreten. Die Signalintensitäten von DAG 32:0 ( $m/z=591$ ) und DAG 34:0 ( $m/z=619$ ) sind deutlich geringer und entsprechen DAG mit zwei 16:0- sowie DAG mit einer 16:0 und einer 18:0-Fettsäure (Tab. 8, Peak 3-4).

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 24: Identifizierung der Diacylglycerol-Spezies von flüssigkonservierten, porcinen Spermatozoen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie**  
**Probe A:** ohne Supplementierung; **Probe B:** Supplementierung mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure; **Probe C:** Supplementierung mit [ $^{13}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure  
 MALDI-TOF-Massenspektren neutraler Lipide, positive Ionendetektion. Der mit „\*“ gekennzeichnete Peak entspricht einem Signal der eingesetzten DHB-Matrix.

**Tabelle 8: Gesamtfettsäurezusammensetzung der neutralen Lipide mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

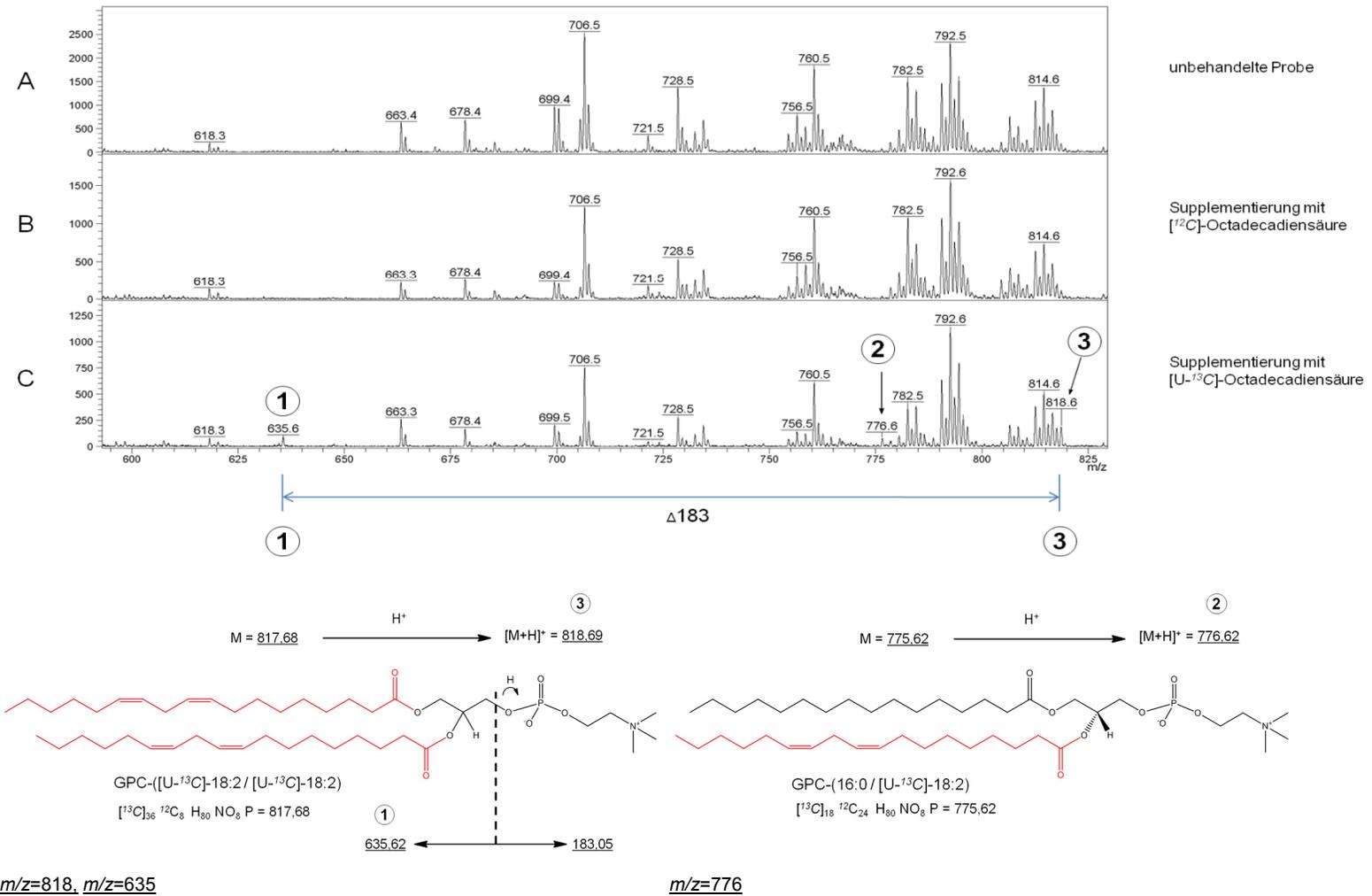
Peak	1,2- bzw. 2,3-Diacylglycerole (DAG)	[M+Na] <sup>+</sup>	Strukturformeln
1	DAG (28:0)	535,4	
2	DAG (30:0)	563,5	
3	DAG (32:0)	591,5	
4	DAG (34:0)	619,5	
⑤	DAG (36:4)	639,5	<p>DAG (18:2/18:2)  <math>^{12}\text{C}_{39} \text{H}_{88} \text{O}_5 = 616,50</math>  <math>m/z=639</math></p>
⑥	DAG ([U- $^{13}\text{C}$ ]-18:2 / [U- $^{13}\text{C}$ ]-18:2)	675,6	<p>DAG ([U-<math>^{13}\text{C}</math>]-18:2 / [U-<math>^{13}\text{C}</math>]-18:2)  <math>[^{13}\text{C}]_{36} \text{ } ^{12}\text{C}_3 \text{H}_{88} \text{O}_5 = 652,63</math>  <math>m/z=675</math></p>
*	Matrix-Moleküle (2,5-DHB)		

Acylreste von [ $^{12}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure sind blau und von [U- $^{13}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure rot dargestellt. Es sind Bruttofettsäurekomposition angegeben; Erläuterungen im Text; MALDI-TOF-MS-Bedingungen siehe 3.7.1.

Nur bei den flüssigkonservierten *Spermatozoen* in Probe B, die mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure supplementiert wurden, ließ sich ein spezifischer Peak ⑤ mit  $m/z=639$  detektieren (Abb. 23, B). Dieser Peak entspricht den  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Quasi-Molekülonen von DAG-36:4, also dem DAG mit zwei [ $^{12}\text{C}$ ]-Octadecadiensäureresten. In der Probe C, die mit dem  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Isotop der Octadecadiensäure supplementiert wurde, ließ sich ebenfalls ein spezifischer Peak ⑥ mit  $m/z=675$  detektieren (Abb. 23, C). Sowohl Peak ⑤ als auch Peak ⑥ sind spezifisch für die jeweilige Supplementierungsvariante und waren in der unbehandelten Kontrollprobe A nicht vorhanden (Abbildung 23). Die Massendifferenz ( $\Delta m$ ) zwischen Peak ⑤ und Peak ⑥ mit  $m/z=675$  und  $m/z=639$  beträgt 36. Dies  $\Delta m$  entspricht somit der zweifachen Massendifferenz zwischen einer „natürlichen“ Octadecadiensäure ( $^{12}\text{C}_{18}$ ) und einer einheitlich  $^{13}\text{C}$ -markierten Octadecadiensäure ( $^{13}\text{C}_{18}$ ). In den *Spermatozoen*-Proben B und C findet somit eine *de-novo* Biosynthese von DAG-Molekülen mit jeweils zwei aus dem Supplementierungsmedium exogen aufgenommenen Octadecadiensäuren statt. Die Ergebnisse konnten ebenfalls gaschromatographisch verifiziert werden. Die metabolische Aufnahme von Octadecadiensäure in DAG wurde sowohl bei unterschiedlichen Individuen ( $n=5$ ) als auch bei den unterschiedlichen Ejakulaten des gleichen Individuums ( $n=2$ ) beobachtet (Daten sind nicht gezeigt). Die Auswertung der MALDI-TOF-Massenspektren zeigt somit, dass keine metabolische Modifizierung der Octadecadiensäure, wie Elongation, Desaturation oder Oxidation stattfindet, wenn sie als DAG vorliegen.

Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der polaren GPC mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie unter gleichen Versuchsbedingungen wie bei den neutralen Lipiden. Nach der Gesamtlipidextraktion (3.6.1) wurden die polaren Lipide über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (3.6.2) und die GPC-Fraktion präparativ aufgereinigt und anschließend mittels MALDI-TOF-MS untersucht (3.7.1). In Abbildung 25 sind die positiv-Ionen MALDI-TOF-Massenspektren von GPC dargestellt. Probe A ist die unbehandelte Kontrollprobe, Probe B wurde mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure und Probe C mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Octadecadiensäure supplementiert.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 25: Analyse von Glycerophosphocholinen porciner Spermatozoen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie**  
**Oben: Probe A:** ohne Supplementierung; **Probe B:** Supplementierung mit [<sup>12</sup>C]-Octadecadiensäure; **Probe C:** Supplementierung mit [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäure  
 MALDI-TOF-Massenspektren von GPC, positive Ionendetektion.  
**Unten:** Strukturformeln von GPC; Acylreste von [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäure sind rot dargestellt. Erläuterungen im Text. MALDI-MS-Bedingungen siehe 3.7.1.

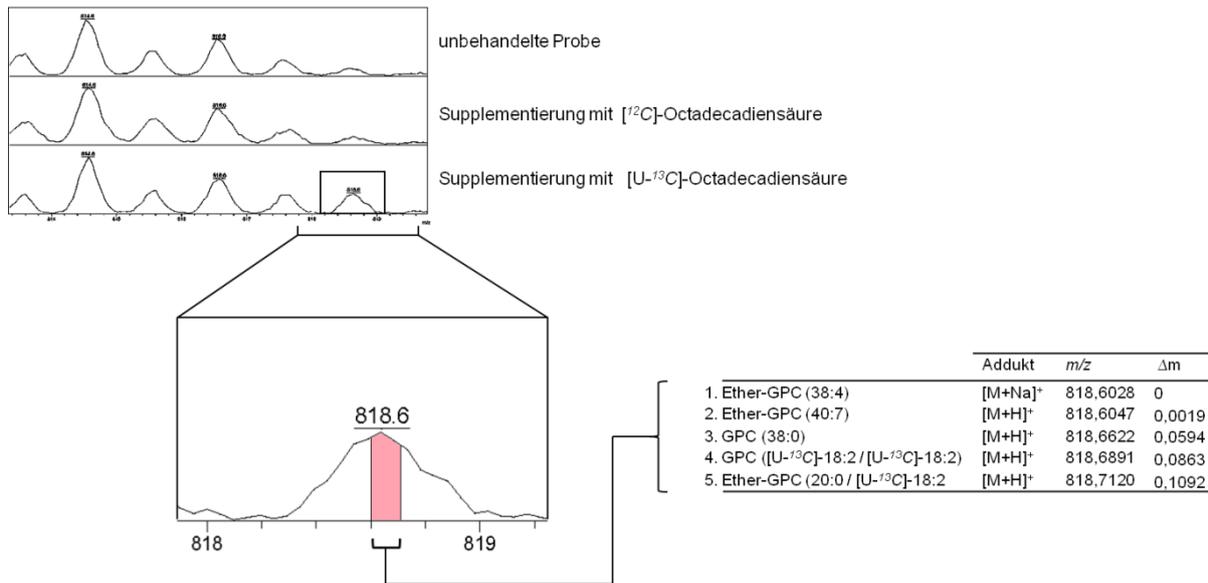
Die Massenspektren zeigen keine jeweils eindeutigen, probenspezifischen Quasimolekülonen von GPC. Bei Probe C konnte verglichen mit den anderen Proben bei drei Peaks eine geringe Zunahme der Intensität beobachtet werden (Abb. 25, C; Peak ①-③). Für diese Peaks wurde eine theoretische Berechnung der möglichen GPC-Quasimolekülonen entsprechend etwa 100 ppm Massengenauigkeit unternommen. Dies hat ergeben, dass es sich um eine sehr große Anzahl von Quasimolekülonen der GPC-Lipide mit nahezu gleichen Massen handeln könnte. In Tabelle 9 sind diese für die theoretischen  $[M+H^+]$ -Quasimolekülonen von GPC mit  $m/z=818$  exemplarisch dargestellt.

**Tabelle 9: Berechnete  $m/z$ -Werte der Quasimolekülonen von theoretisch vorkommenden GPC im Massenbereich von 818,5 bis 818,8**

		Summenformel	Atommasse	$m/z$
1	GPC-38:0	$C_{46}H_{92}NO_8P$	817,7	$[M+H^+]$ 818,7
2	GPC-36:4 ( $^{13}C_{36}$ )	$^{13}C_{36}C_8H_{80}NO_8P$	817,7	$[M+H^+]$ 818,7
3	Ether-GPC-40:7	$C_{48}H_{84}NO_7P$	817,6	$[M+H^+]$ 818,6
4	Ether-GPC-38:2 ( $^{13}C_{18}$ )	$^{13}C_{18}C_{28}H_{90}NO_7P$	817,7	$[M+H^+]$ 818,7

Unter Berücksichtigung aller theoretisch möglichen  $[M+Na^+]$ -Quasimolekülonen von GPC und der eventuell vorkommenden Oxidationsprodukte würde sich die Anzahl der möglichen Quasimolekülonen in diesem Massenbereich deutlich erhöhen. Daher ist eine exakte Zuordnung der theoretisch berechneten zu den tatsächlich detektierten Massen bei der hier verfügbaren Massengenauigkeit von etwa 100 ppm nicht möglich. Ein weiteres Problem bei der Auswertung der Massenspektren ergibt sich, wenn die Quasimolekülonen in einem komplexen Gemisch vorliegen und außerdem nahezu gleiche Massen aufweisen. In der Abbildung 26 ist der Massenbereich von  $m/z$  818 bis 819 aus dem oben gezeigten MALDI-TOF-Massenspektrum vergrößert dargestellt um das Problem zu verdeutlichen.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 26: MALDI-TOF-Massenspektrum, Massenbereich  $m/z=818$  bis  $m/z=819$**

**Oben:** MALDI-TOF-Massenspektren, positive Ionendetektion

**Unten:** Ein vergrößerter Ausschnitt aus dem Gesamtspektrum im Bereich  $m/z=818-819$  von Probe C

Die Massendifferenzen ( $\Delta m$ ) wurden in dieser Abbildung vereinfacht nur auf das [M+Na]<sup>+</sup>-Quasimolekülion von Ether-GPC (38:4) bezogen. Eine eindeutige Zuordnung der Quasimolekülionen ist anhand der gegebenen Massenauflösung nicht möglich.

Desweiteren sei angemerkt, dass die porcinen *Spermatozoen* durch eine große Vielfalt an unterschiedlichen GPC-Spezies gekennzeichnet sind (4.1). Die fünf exemplarisch berechneten Quasimolekülionen könnten in diesem Massenbereich alle vorhanden sein. Die in diesem Beispiel berechneten Massendifferenzen liegen zwischen 0,0019 und 0,1092. Die benötigte Massenauflösung zur Auftrennung dieser Signale auseinander liegt daher im Bereich 430.800 und 7.500. Unter den hier gegebenen experimentellen Bedingungen ist somit eine eindeutige Zuordnung anhand der zuvor berechneten Massen der Quasimolekülionen nicht möglich. Die Auswertung wird zusätzlich durch die Bildung unterschiedlicher Addukte erschwert. GPC bildet während der Ionisation sowohl [M+H]<sup>+</sup>- als auch [M+Na]<sup>+</sup>-Addukte, wobei einige Spezies hierbei nahezu gleichen Massen aufweisen können (Schiller *et al.*, 1999; Schiller *et al.*, 2007). Beispielsweise unterscheiden sich die Massen des [M+Na]<sup>+</sup>-Quasimolekülions von Ether-GPC (38:4) und des [M+H]<sup>+</sup>-Quasimolekülion von GPC (38:0) nur durch  $\Delta m=0,0594$ .

Die in der Abbildung 25 konnten somit Peaks ② und ③ in der Probe C wegen der großen Anzahl von möglichen vorkommenden Quasimolekülionen nicht eindeutig einem bestimmten Lipid zugeordnet werden. Anhand des Vergleichs der theoretisch

berechneten mit den experimentell ermittelten Werten wurde angenommen, dass alle für Probe C spezifischen Signale durch eine metabolische Aufnahme von chemisch supplementierter  $[U-^{13}C]$ -Octadecadiensäure in GPC entstanden sind. Peak ① könnte durch eine Fragmentierung des Mutter-Quasimoleküls (Peak ③) erklärt werden. Das verwendete MALDI-TOF-Massenspektrometer war nicht mit einer Kollisionszelle mit CID-Fragmentierung (stoßverursachte, *collision-induced decay*, CID) ausgestattet. Es ist jedoch bekannt, dass durch Beschleunigung des Analyts oder Kollisionen mit Spuren der Gasmoleküle bei MALDI-TOF-Techniken eine spontane PSD-Fragmentierung (*post-source decay*, PSD) erfolgen kann. Dieses Phänomen wurde erstmals bei der MALDI-TOF-Untersuchungen an Proteinen beschrieben (Spengler *et al.*, 1991). Die Autoren haben gezeigt, dass Mutter-Quasimoleküle nach dem Verlassen der Quelle während der Beschleunigung bzw. des Fluges einem spontanen Zerfall in ein geladenes Tochterion und in ein neutrales Fragmentmolekül unterliegen. In diesem Experiment könnten somit durch die PSD-Fragmentierung von GPC- $([U-^{13}C]-18:2 / [U-^{13}C]-18:2)$  zwei Tochter-Ionen entstehen, wobei nur ein geladenes Tochter-Quasimolekülion (Peak ①) mit  $m/z=635,6$  detektiert würde. Die nicht detektierte Cholin-Kopfgruppe ( $m/z=183$ ) bliebe unter diesen Bedingungen neutral. Peak ② mit  $m/z=776$  könnte den  $[M+H]^+$ -Quasi-Moleküle von GPC (16:0 /  $[U-^{13}C]-18:2$ ) zugeordnet werden (Anhang 8.1.1). Somit lieferten die hier für GPC dargestellten Ergebnisse nur Hinweise, gaben aber keine direkten Beweise darüber, ob ein metabolischer Einbau von Octadecadiensäure in GPL tatsächlich stattfindet.

Zusammenfassend wurde anhand der MALDI-TOF-Untersuchungen in den mit Octadecadiensäure supplementierten porcinen *Spermatozoen* eine *de-novo* Entstehung von PUFA-DAG nachgewiesen. Die metabolischen Produkte, die auf eine Oxidation, Desaturation oder Elongation der den *Spermatozoen* zugesetzten Octadecadiensäure hindeuteten, wurden nicht beobachtet. Desweiteren lieferten die MALDI-TOF-MS-Untersuchungen nur erste Hinweise auf einen metabolischen Einbau von Octadecadiensäure in GPC. Dies sollte anhand anderer massenspektrometrischen Methoden weiter untermauert werden (4.3.5).

#### 4.3.5 Analyse des Einbaus von [<sup>12</sup>C]-, [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäure in DRG und GPC mittels Q-TOF-MS

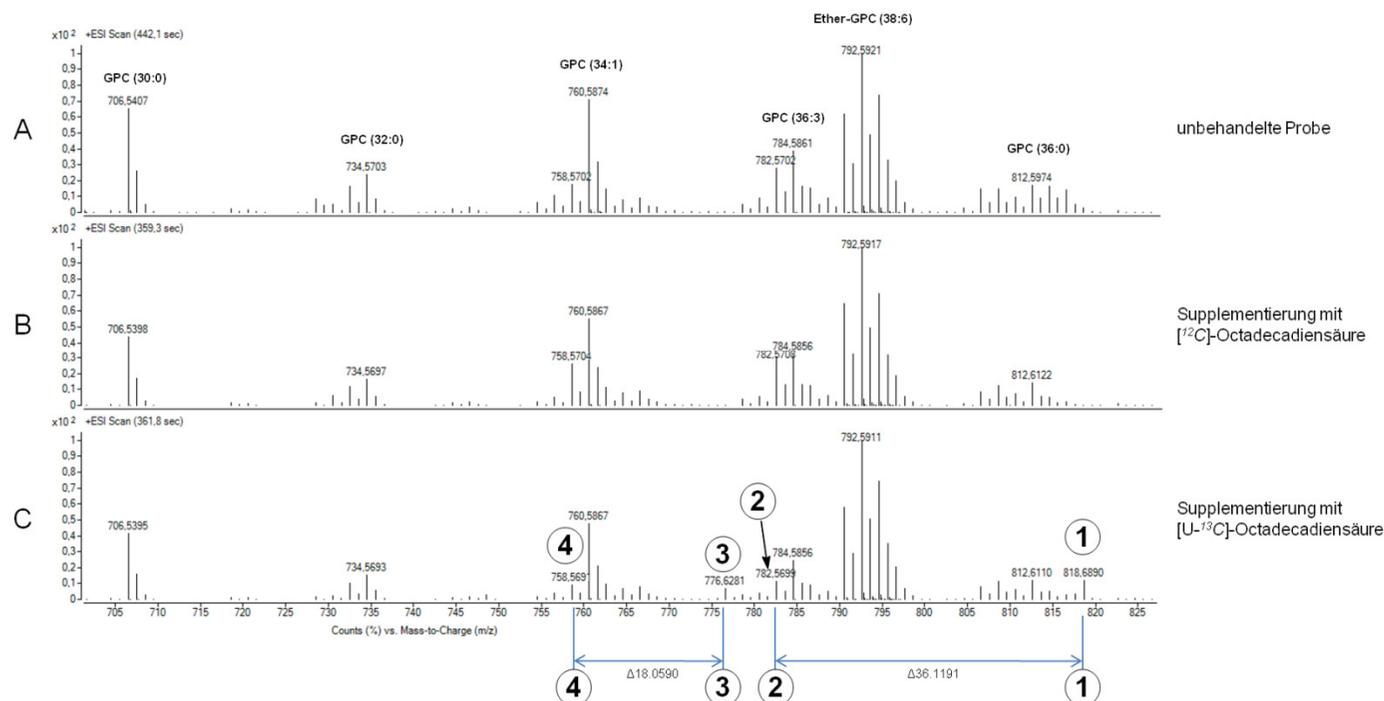
Die radiochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die zu den porcinen *Spermatozoen* zugesetzte Octadecadiensäure metabolisch in die Lipide eingebaut wird. Mittels MALDI-TOF-MS konnte der metabolische Einbau in DAG eindeutig nachgewiesen werden. Weiterhin gab es Hinweise auf den Einbau der artifiziell zugesetzten (chemisch supplementierten) Fettsäure in die GPC. Zur Bestätigung dieser Hinweise und zur genaueren Charakterisierung der neutralen Lipide wurde sowohl DAG als auch GPC mittels Q-TOF-MS untersucht. Diese Methode zeichnet sich laut Herstellerangaben zum einen durch eine hohe Massenauflösung (bis 50.000) und zum anderen durch eine Massengenauigkeit ( $\Delta m$ ) bis 1 ppm aus. Das Detektionslimit liegt aufgrund der geringen Peakbreite im *attomolaren* Bereich. Daher können die gesuchten Quasimoleküle aufgrund der hohen Massengenauigkeit direkt identifiziert werden. Liegen diese Quasimoleküle jedoch in einem Lipidgemisch unterschiedlicher Lipidspezies mit nahezu gleichen Massen vor, so können diese zusätzlich einer Quadrupolselektion mit anschließender Fragmentierungsanalyse unterzogen werden. Hierzu erfolgt eine zweifache Massenanalyse. Bei der ersten werden zuerst die Mutter-Quasimoleküle im Quadrupol nach Bedarf in einem engen  $m/z$ -Verhältnis ( $\Delta m \pm 0,5$  [u]) selektiert. Bei der nachgeschalteten zweiten Massenanalyse werden dann nur die so selektierten Quasimoleküle in Tochter-Ionen fragmentiert. Die Auswertungen der MS / MS-Spektren geben Rückschlüsse über die chemische Struktur der ursprünglichen Mutter-Quasimoleküle. Voraussetzung sowohl für den direkten Nachweis der gesuchten Quasimoleküle anhand der Masse, als auch für die nachfolgende Selektion mittels Quadrupol ist, dass die Massen der Quasimoleküle zuvor bekannt sein müssen. Da bei einem Q-TOF Lauf durch die große Anzahl hintereinander aufgenommener Massenspektren enorm große Datenmengen entstehen, ist die manuelle Berechnung der Quasimolekülmassen und der anschließende Vergleich mit dem Massenspektrum ineffizient und sehr zeitaufwendig. Kommerzielle Datenbanken zur Lipidanalytik der *Spermatozoen* sind *bis dato* nicht verfügbar. Daher wurden in dieser Arbeit alle Lipidklassen, die durch radiochemische- sowie MALDI-TOF-MS-Untersuchungen identifiziert wurden, in einer Datenbank zusammengefasst (Anhang 8.1.1). Die Datenbank enthält Summenformeln, Atom- und Isotopen-

Massen, Fettsäure- und Fettaldehydreste sowie die Massen von möglichen Ionisations- und Fragmentierungs-Addukte und umfasst alle möglicherweise vorkommenden Glycerophosphocholine (GPC), Diradylglycerole (DRG), Monoradylglycerole (MRG) inklusive deren *plasmanyl*- und *plasmenyl*- Formen. In der Datenbank wurden alle *bis dato* in der Fachliteratur für Säugertierspermatozoen beschriebenen, als auch kaum beschriebene Fettsäure- und Fettaldehyd-Reste von GPL mit einer Kettenlänge von 12:0 bis 34:6 berücksichtigt (Poulos *et al.*, 1986). Zusätzlich wurden auch alle kombinatorischen Möglichkeiten des metabolischen Einbaus von [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäure in diese Lipidklassen der porcinen *Spermatozoen* berücksichtigt. Die Identifizierung der einzelnen Lipide erfolgte anhand eines Computer-gestützten Vergleichs der berechneten mit den mittels Q-TOF-MS detektierten Massen. Um eine Verwechslung unterschiedlicher Ionen mit exakt gleichen Massen ausschließen zu können, wurden anschließend Fragmentierungsanalysen durchgeführt.

#### **4.3.5.1 Analyse des Einbaus von [<sup>12</sup>C]-, [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäure in GPC mittels Q-TOF-MS**

Um die Hinweise der MALDI-TOF-MS-Untersuchungen über die metabolische Aufnahme von chemisch supplementierter Octadecadiensäure in GPC zu überprüfen, erfolgte eine genauere Analyse mittels Q-TOF-MS. Die *Spermatozoen* wurden ebenfalls, wie in 4.3.4 beschrieben, mit Octadecadiensäure supplementiert. Nach der Gesamtlipidextraktion (3.6.1) wurden die Lipide über DC aufgetrennt (3.6.2), präparativ aufgereinigt und anschließend einer Q-TOF-MS-Untersuchung unterzogen (3.7.2). Die GPC-Lipidklasse bei positiver Ionendetektion wird hierbei in Anwesenheit von Ammoniumacetat in erster Linie als [M+H]<sup>+</sup>-Quasimolekülonen detektiert (Devaiah *et al.*, 2006).

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



Peak	Summenformel	berechnet $[\text{M}+\text{H}]^+$ [u]	gemessen $[\text{M}+\text{H}]^+$ [u]	$\Delta m$ [u]	
①	GPC ( $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -18:2 / $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -18:2)	$[\text{C}^{13}]_{36}\text{C}_8\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}$	<b>818,6902</b>	<b>818,6890</b>	<b>0,0012</b>
②	GPC (18:2/18:2)	$\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}$	<b>782,5694</b>	<b>782,5699</b>	<b>0,0005</b>
③	GPC (16:0 / $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -18:2)	$[\text{C}^{13}]_{18}\text{C}_{24}\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}$	<b>776,6298</b>	<b>776,6281</b>	<b>0,0017</b>
④	GPC (16:0/18:2)	$\text{C}_{42}\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}$	<b>758,5694</b>	<b>758,5691</b>	<b>0,0003</b>
<b>Δ36</b>	$[\text{U}-^{13}\text{C}_{36}]$ - $^{12}\text{C}_{36}$	$2 \times (^{13}\text{C}_{18} - ^{12}\text{C}_{18})$	<b>36,1208</b>	<b>36,1191</b>	<b>0,0017</b>
<b>Δ18</b>	$[\text{U}-^{13}\text{C}_{18}]$ - $^{12}\text{C}_{18}$	$^{13}\text{C}_{18} - ^{12}\text{C}_{18}$	<b>18,0604</b>	<b>18,0590</b>	<b>0,0014</b>
	Oxidationsprodukt von GPC (34:1)	$\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{NO}_9\text{P}$	<b>776,5805</b>	<b>776,6281</b>	<b>0,0476</b>

**Abbildung 27: Analyse von Glycerophosphocholin porciner Spermatozoen mittels Q-TOF-Massenspektrometrie**

**Oben: Probe A:** ohne Supplementierung; **Probe B:** chemische Supplementierung mit  $[^{12}\text{C}]$ -Octadecadiensäure; **Probe C:** chemische Supplementierung mit  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -Octadecadiensäure.

Q-TOF-Massenspektren von GPC nach präparativer Aufreinigung, positive Ionendetektion.

**Unten:** Tabelle der theoretisch berechneten und experimentell ermittelten  $m/z$ -Werte der  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasimolekülonen. Massengenauigkeit:  $3 \times 10^{-4}$  bis  $17 \times 10^{-4}$  [u].

In der Abbildung 27 sind Q-TOF-Massenspektren von Probe A (als unbehandelte Kontrollprobe), Probe B wurde mit [ $^{12}\text{C}$ ]—Octadecadiensäure und Probe C mit [ $\text{U-}^{13}\text{C}$ ]—Octadecadiensäure supplementiert, dargestellt. In allen untersuchten Proben (A-C) von porcinen *Spermatozoen* lassen sich die Hauptvertreter von GPC nachweisen. Diese sind Ether-GPC (38:6) sowie *diacyl*-GPC (30:0), (32:0), (34:1), (36:3) und (36:0). Das stimmt mit den vorangegangenen MALDI-TOF-MS Untersuchungen überein (Kapitel: 4.1, 4.3.4). Bei den flüssigkonservierten *Spermatozoen* in Probe C, die mit [ $^{13}\text{C}$ ]—Octadecadiensäure supplementiert wurden, ließen sich zwei nur für diese Probe spezifische Signale detektieren. Diese sind Peak ① und Peak ③ mit  $m/z=776,6281$  und  $m/z=818,6890$  (Abb. 27, C). Der computergestützte Vergleich der experimentell gemessenen mit den theoretisch berechneten Massen der Datenbank hat ergeben, dass Peak ① dem  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasi-Molekülion von GPC ( $[\text{U-}^{13}\text{C}]-18:2 / [\text{U-}^{13}\text{C}]-18:2$ ) entspricht. Dieses *diacyl*-GPC enthält somit zwei einheitlich  $^{13}\text{C}$ -markierte Octadecadiensäuren aus dem Supplementierungsmedium. Peak ③ konnte dem  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasi-Molekülion von GPC (16:0 /  $[\text{U-}^{13}\text{C}]-18:2$ ) zugeordnet werden. Dieses *diacyl*-GPC enthält somit eine endogene 16:0- und eine einheitlich  $^{13}\text{C}$ -markierten exogene Octadecadiensäure. Peak ② mit  $m/z=782,5683$  und Peak ④ mit  $m/z=758,5683$  kommen in allen Proben vor, und weisen in Probe B, die mit  $^{12}\text{C}$ -Octadecadiensäure supplementiert wurde, eine deutliche höhere Signalintensität verglichen mit den beiden anderen Proben auf. Der computergestützte Vergleich der experimentell gemessenen mit den theoretisch berechneten Massen der Datenbank hat ergeben, dass Peak ② dem  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasi-Molekülion von GPC (18:2 / 18:2) entspricht. Dieses *diacyl*-GPC enthält somit zwei natürlich vorkommenden  $^{12}\text{C}$ -Octadecadiensäurereste. Peak ④ konnte dementsprechend dem  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasi-Molekülion von GPC (16:0 / 18:2) zugeordnet werden und enthält eine endogene 16:0- und eine natürlich vorkommende  $^{12}\text{C}$ -Octadecadiensäure. Die Massendifferenz ( $\Delta m$ ) zwischen den Peaks ② und ④ und den nur für die Probe C spezifischen Peaks ① und ③ beträgt ( $\Delta m=18$  [u]) bzw. ( $\Delta m=36$  [u]). Die einfache Massendifferenz ( $\Delta m=18$  [u]) entspricht dem Unterschied der Massen einer einheitlich  $^{13}\text{C}$ -markierten Octadecadiensäure und der Masse einer „natürlichen“  $^{12}\text{C}$ -Octadecadiensäure ( $[\text{U-}^{13}\text{C}_{18}] - ^{12}\text{C}_{18}=18$ ). Somit entspricht die zweifache Massendifferenz ( $\Delta m=36$  [u]) dem Unterschied der Massen von zwei einheitlich  $^{13}\text{C}$ -markierten Octadecadiensäuren im Vergleich zur Masse von zwei

„natürlichen“  $^{12}\text{C}$ -Octadecadiensäuren ( $[\text{U-}^{13}\text{C}_{36}] - ^{12}\text{C}_{36}=36$ ). Die Differenzen zwischen den experimentell gemessenen Massen der Quasimolekülonen zu den vorher theoretisch ermittelten Massen zeigen eine maximale Abweichung von  $17 \times 10^{-4}$ . Die spezifischen Peaks in Probe C könnten durch eine Oxidation von bereits vorhandenen, endogen Lipiden entstanden sein. Beispielhaft wurde hier für GPC (34:1,  $\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{NO}_8\text{P}$ ) mit  $m/z=760,5867$  die Masse des Oxidationsproduktes berechnet ( $\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{NO}_9\text{P}$ ). Die Massendifferenz zwischen den theoretisch ermittelten und den detektierten Werten beträgt  $476 \times 10^{-4}$  und ist somit 40-fach höher im Vergleich zu den maximalen in diesem Experiment ermittelten Abweichungen von  $17 \times 10^{-4}$  [u]. Daher kann eine Oxidation von bereits endogenen Lipiden unter diesen experimentellen Bedingungen ausgeschlossen werden. Metabolische Modifikationen der zu den *Spermatozoen* zugesetzte Octadecadiensäure wie deren Desaturation oder Elongation wurden ebenfalls nicht beobachtet.

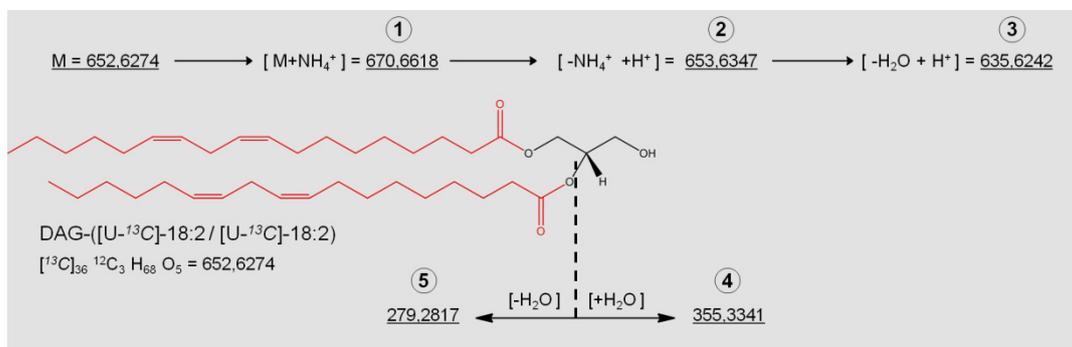
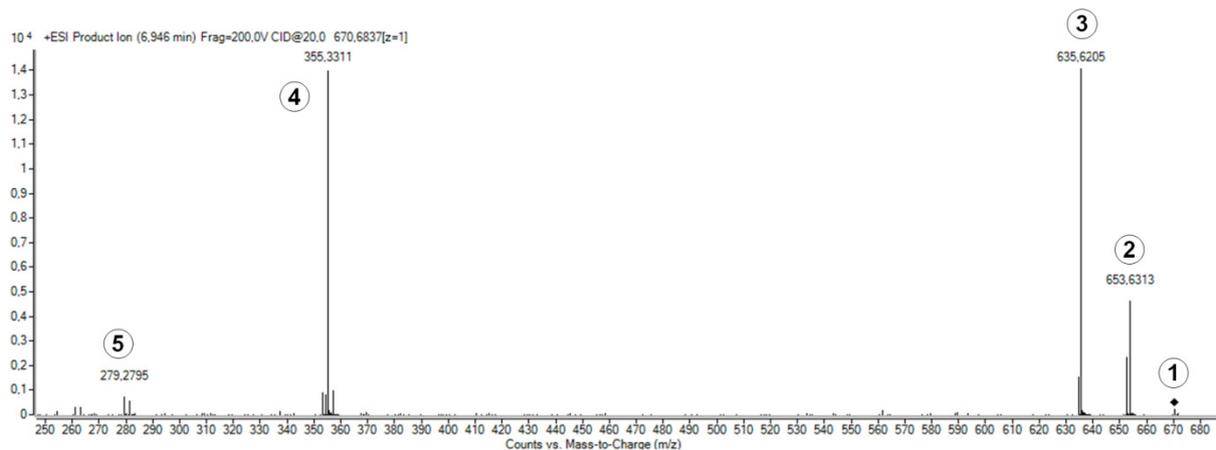
Zusammenfassend wurde mittels Q-TOF-MS der metabolische Einbau von Octadecadiensäure in GPC nachgewiesen. Da die Octadecadiensäure in der gesamten GPC-Klasse porciner *Spermatozoen* mit ca. 15 mol% endogen vorkommt (Kapitel 4.2), konnte deren metabolische Aufnahme in die *diacyl*-GPC nur anhand der Supplementierung mit einheitlich  $^{13}\text{C}$ -markierter Octadecadiensäure nachgewiesen werden. Die identifizierten Lipidspezies sind GPC (16:0 / 18:2) und GPC (18:2 / 18:2). Chemische Modifikationen der in GPC metabolisch aufgenommenen Octadecadiensäure wie Oxidation, Desaturation oder Elongation, wurden nicht beobachtet.

#### **4.3.5.2 Analyse des Einbaus von $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Octadecadiensäure in DRG mittels Q-TOF-MS / MS**

Die radiochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die zu porcinen *Spermatozoen* supplementierte  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure ebenfalls in 1,2-DAG metabolisch eingebaut wird. Bei der Auswertung der Autoradiogramme migrierte ein unbekanntes radioaktiv markiertes Lipid nahe der Position der 1,2-DAG. Mittels MALDI-TOF-MS wurde gezeigt, dass nach einer chemischen Supplementierung mit exogener Octadecadiensäure eine *de-novo* Biosynthese von DAG stattfindet. Um diese Ergebnisse zu verifizieren und das unbekannte neutrale Lipid zu identifizieren, wurde der Gesamtlipidextrakt mittels Q-TOF-MS analysiert (3.7.2). In Anwesenheit von Ammoniumacetat lassen sich neutrale Lipide (TRG, DRG, MRG) als

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

$[M+NH_4]^+$ -Quasimoleküle detektieren (Kalo *et al.*, 2006). Es wurden zwei separate Experimente durchgeführt. Für beide Experimente wurden porcine *Spermatozoen* mit  $[U-^{13}C]$ -Octadecadiensäure chemisch angereichert. Nach der Gesamtlipidextraktion wurden die Quasimoleküle im Quadrupol selektiert. Für jede Probe wurde anhand der Datenbank der zu untersuchende Massenbereich bestimmt. Die anschließenden Fragmentierungsanalysen lieferten detailliertere Informationen über die chemische Struktur der so selektierten Quasimoleküle. Im ersten Experiment wurden die Quasimoleküle von DAG ( $[U-^{13}C]$ -18:2 /  $[U-^{13}C]$ -18:2), also DAG mit zwei Molekülen einheitlich  $^{13}C$ -markierter Octadecadiensäurereste untersucht. Diese  $[M+NH_4]^+$ -Quasimoleküle wurden mittels Quadrupol anhand ihrer theoretisch ermittelten Masse von 670,6 mit ( $\Delta m \approx 0,2$  [u]) selektiert und diese anschließend fragmentiert. In Abbildung 28 ist das MS / MS-Spektrum und das Fragmentierungsschema des Quasimoleküls dargestellt.



**Abbildung 28: MS / MS-Spektrum und Fragmentierungsschema des  $[M+NH_4]^+$ -Quasimoleküls mit  $m/z=670$**

**Oben:** Analyse des Gesamtlipidextraktes, Q-TOF-Massenspektrum, positive Ionendetektion

**Unten:** Fragmentierungsschema des  $[M+NH_4]^+$ -Quasimoleküls mit  $m/z=670$

Fragmentor-Spannung 200 V, Quadrupol-Selektion, Kollisionsenergie 20 V

Im MS / MS-Spektrum lassen sich fünf Peaks erkennen. Peak ① ist das zuvor selektierte, unfragmentierte Mutter-[M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>-Quasimolekülion mit  $m/z=670$ . Bei der hier verwendeten Kollisionsenergie wurde dies nahezu vollständig fragmentiert. Peak ② ist auf den Verlust der Ammoniumgruppe des Mutter-Quasimolekülions und Peak ③ auf den zusätzlichen Verlust eines Wassermoleküls zurückzuführen. Peak ④ und ⑤ können durch die Abspaltung des *acyl*-Restes erklärt werden (Abb. 28, unten). Die Massendifferenz für die Tochter-Quasimolekülionen zwischen den theoretisch ermittelten und den detektierten Werten beträgt maximal  $30 \times 10^{-4}$  [u]. Daher kann das Mutter-Quasimolekülion mit  $m/z=670$  als DAG ([U-<sup>13</sup>C]-18:2 / [U-<sup>13</sup>C]-18:2) identifiziert werden. Somit findet in den porcinen flüssigkonservierten *Spermatozoen* eine Biosynthese von DAG-Molekülen mit jeweils zwei aus dem Supplementierungsmedium exogen aufgenommenen Molekülen [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäuren statt. Die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Untersuchung konnten somit verifiziert werden.

Das zweite Experiment diente zu Charakterisierung des unbekanntes Lipids, welches in den vorangegangenen radiochemischen Untersuchungen während der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der neutralen Lipide mit 1,2-DAG co-migrierte (Abb. 22, I-B). Daher konnte angenommen werden, dass dieses neutrale Lipid im Vergleich zu DAG eine sehr ähnliche chemische Struktur aufweist und möglicherweise der DRG-Lipidklasse zugeordnet werden kann. Ein Hinweis über die exakte Masse dieses unbekanntes Lipides lag wie im vorangegangenen Versuch nicht vor. Daher wurden zum einen alle kombinatorischen Möglichkeiten des metabolischen Einbaus von [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäuren in DRG porciner *Spermatozoen* berücksichtigt. Zum anderen wurden zusätzlich alle möglicherweise vorkommenden Kombinationen von endogen vorhandenen Fettsäuren und Fetaldehyden in DRG für die Quadrupol-Selektion mit einbezogen. Ausführliche Informationen über die untersuchten Massen der kombinatorisch möglichen Quasimolekülionen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht dargestellt sondern dem Anhang 8.1.1 zu entnehmen. Nach der Gesamtlipidextraktion wurden die Quasimolekülionen zuerst selektiert und einer anschließenden Fragmentierung unterzogen. Dann wurden die Fragmentierungsmuster jedes einzelnen selektierten Ions der unbehandelten mit der behandelten Probe computergestützt paarweise miteinander verglichen. Bei der Auswertung der MS / MS-Massenspektren wurde nur

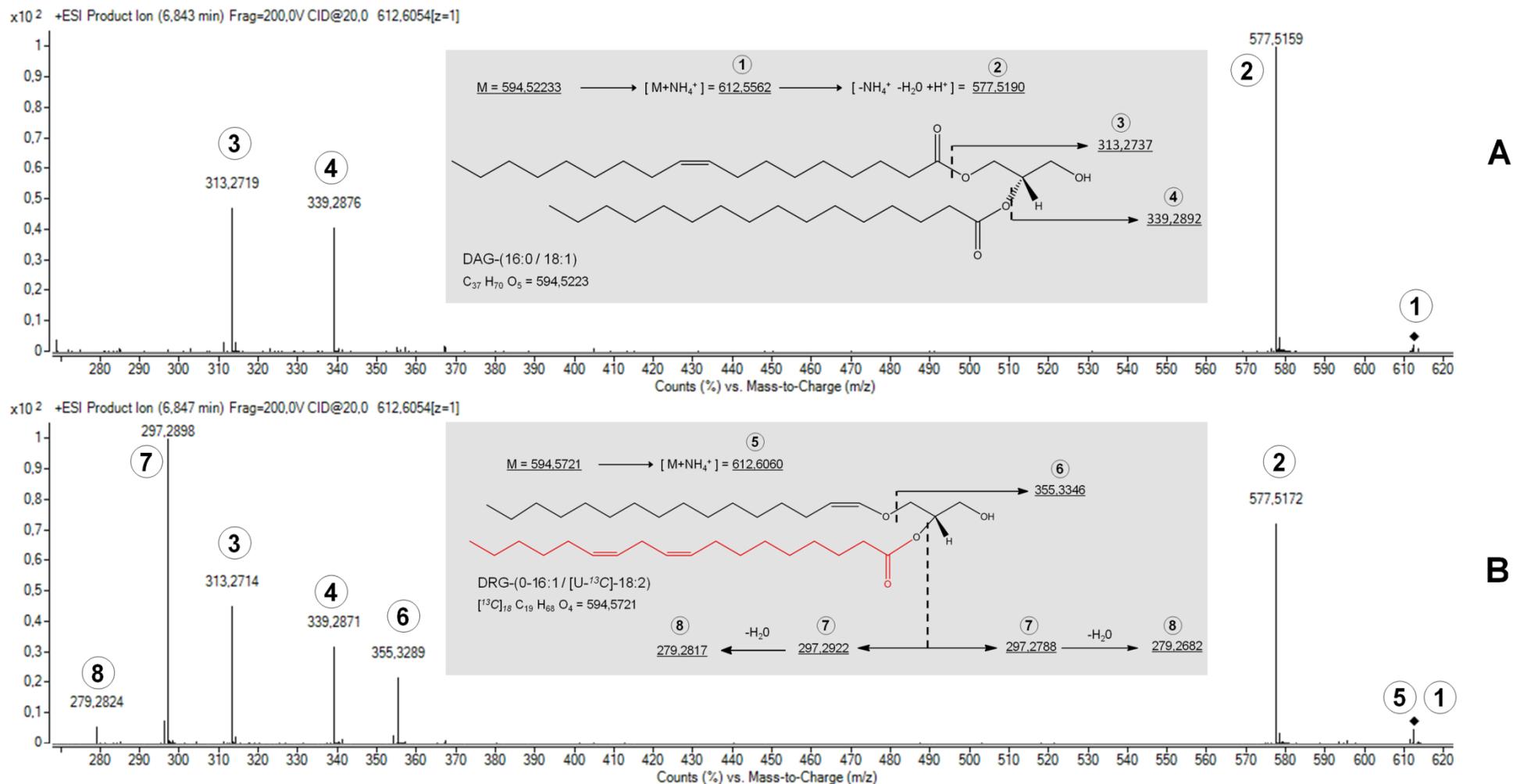
bei den Quasimolekülonen mit  $m/z = 612,6$  ( $\Delta m \approx 0,2$  [u]) ein abweichendes Fragmentierungsmuster beobachtet. In Abbildung 29 sind diese Spektren für die unbehandelte Kontrollprobe A und die mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure chemisch supplementierte Probe B dargestellt.

In dem MS/MS-Spektrum der unbehandelten Probe A lassen sich bei der Fragmentierung des Mutter-Quasimolekülonen mit  $m/z=612$  vier Peaks erkennen. Peak ① entspricht dem zuvor selektierten, unfragmentierten Mutter-[M+NH $_4$ ] $^+$ -Quasimolekülon mit  $m/z=612$ . Bei der hier verwendeten Kollisionsenergie wurde es nahezu vollständig fragmentiert. Peak ② repräsentiert das Mutter-Quasimolekülon nach Verlust der Ammoniumgruppe und eines Wassermoleküls. Peak ③ und Peak ④ können durch die Abspaltung des *acyl*-Restes erklärt werden (Abbildung 29, A). Die Massendifferenz für die Tochter-Quasimolekülonen beträgt zwischen den theoretisch ermittelten und den detektierten Werten maximal  $18 \times 10^{-4}$  [u]. Der computergestützte Vergleich der experimentell gemessenen mit den theoretisch berechneten Massen der Datenbank hat ergeben, dass Peak ① dem [M+H] $^+$ -Quasi-Molekülon von DAG (34:1), also DAG (16:1 / 18:0), DAG (16:0 / 18:1) oder DAG (12:0 / 22:1) zugeordnet werden kann. Anhand der Fragmentierungsanalysen wurde dieses endogene Lipid als DAG (16:0 / 18:1) identifiziert. In dem MS / MS-Spektrum der mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure angereicherten Probe B lassen sich die Fragmente von endogenem DAG (16:0 / 18:1) ebenfalls nachweisen. Drei Fragmente sind zusätzlich vorhanden und stellen die Tochter-Quasimolekülonen des unbekanntes Lipids dar. Die Quadrupol-Selektion erfolgte in diesem Experiment im Massenbereich von  $m/z=612,6$  mit ( $\Delta m \approx 0,2$  [u]). Daher besitzen sowohl das bereits identifizierte DAG (16:0 / 18:1) als auch das unbekanntes Lipid nahezu gleiche Massen. Anhand der Datenbank können diesem definierten Massenbereich mindestens fünf unterschiedliche Lipid-Quasimolekülonen zugeordnet werden (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Berechnete  $m/z$ -Werte der Quasimolekülonen von theoretisch vorkommenden Lipiden im Massenbereich von 612,4 bis 612,8**

	Summenformel	Atommasse	$m/z$
1 mono-Ether-GPC (24:2)	C $_{32}$ H $_{64}$ N O $_6$ P	589,4471	[M+Na $^+$ ] 612,4363
2 mono-Ether-GPC (26:5)	C $_{34}$ H $_{62}$ N O $_6$ P	611,4315	[M+H $^+$ ] 612,4381
3 mono- <i>acyl</i> -GPE (28:5)	C $_{33}$ H $_{58}$ N O $_7$ P	611,3950	[M+Na $^+$ ] 612,4024
4 DAG (34:1)	C $_{37}$ H $_{70}$ O $_5$	594,5223	[M+NH $_4$ $^+$ ] 612,5562
5 DRG (0-16:1 / [U- $^{13}\text{C}$ ]-18:2)	$^{13}\text{C}_{18}$ C $_{19}$ H $_{68}$ O $_4$	594,5721	[M+NH $_4$ $^+$ ] 612,6060

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 29: MS/MS-Spektren und Fragmentierungsschemata des  $[M+NH_4]^+$ -Quasimoleküls mit  $m/z=612$**

**Probe A:** Unbehandelte Probe; **Probe B:** Supplementierung mit  $[U-^{13}C]$ -Octadecadiensäure

Fragmentierungsschemata (grau markiert)

Quasimolekül in Probe A  $m/z = 612,55$  (Peak ①) und in Probe A und B  $m/z = 612,60$  (Peak ⑤) und  $m/z = 612,55$  (Peak ①).

Analyse eines Gesamtlipidextraktes, Q-TOF-Massenspektrum positiver Ionendetektionsmode mit einer Fragmentor-Spannung 200 V, Quadrupol-Selektion, Kollisionsenergie 20 V.

DAG (34:1) kommt endogen sowohl in behandelten als auch in der unbehandelten Proben vor und wurde als DAG (16:0 / 18:1) identifiziert. Die weiteren potentiellen Quasimolekülonen wurden einer *in-silico* Fragmentierung unterzogen. Nur die Fragmente von DRG (0-16:1 / [U-<sup>13</sup>C]-18:2) stimmten mit den experimentell ermittelten Fragmenten mit einer Massengenauigkeit von  $44$  bis  $57 \times 10^{-4}$  [u] überein.

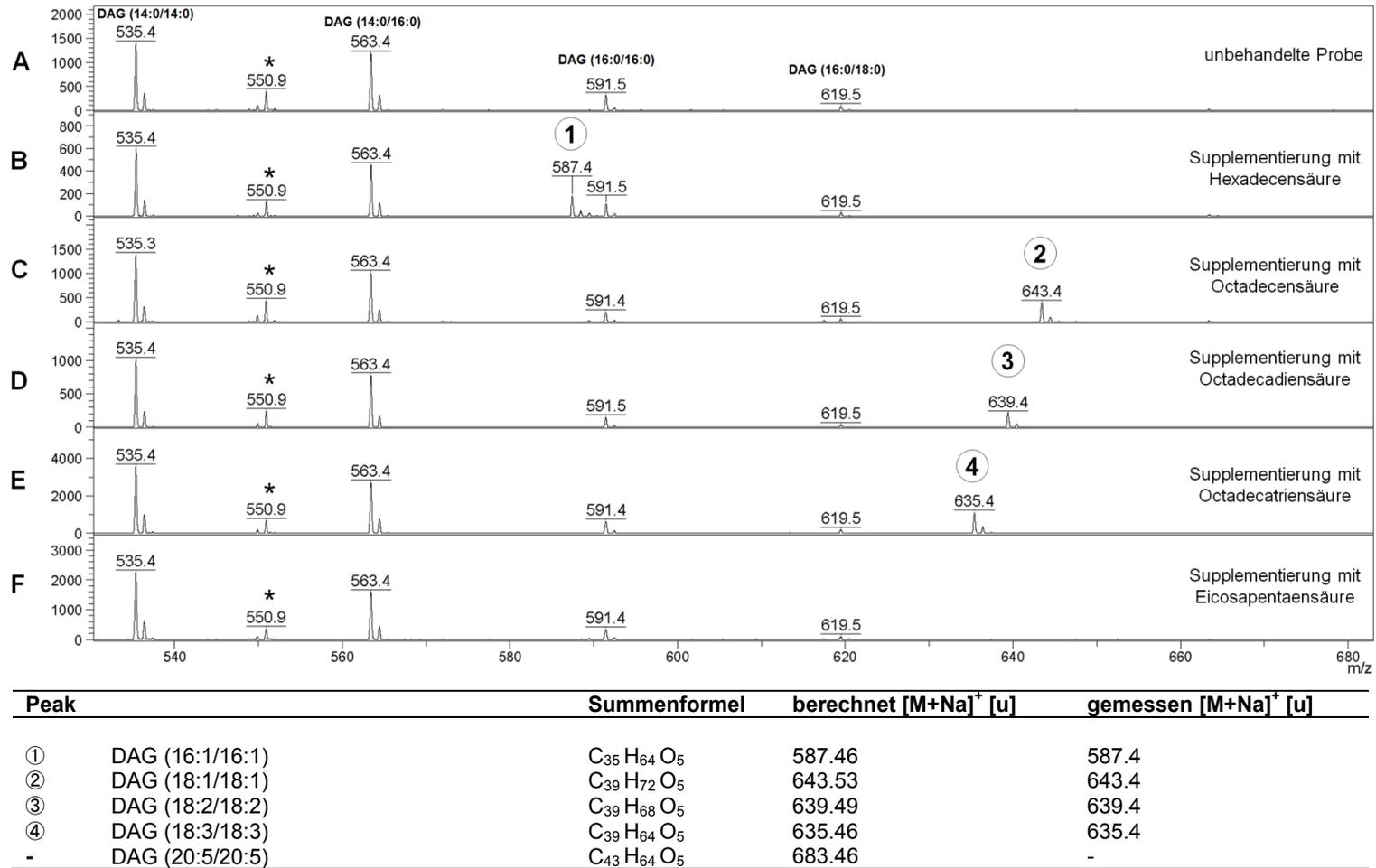
In dem MS / MS-Spektrum der behandelten Probe B wurden das Mutter-Quasimolekülonen mit  $m/z=612,6$  ( $\Delta m \approx 0,2$  [u]) sowohl von endogenem DAG (16:0 / 18:1) als auch von dem unbekanntem Lipid fragmentiert. Das spezifische Fragmentierungsmuster des Quasimolekülonen der mit [U-<sup>13</sup>C] supplementierten Probe ist durch Peak ⑤ bis Peak ⑧ gekennzeichnet. Peak ⑤ stellt das zuvor selektierte, unfragmentierte Mutter-Quasimolekülon des unbekanntem Lipids dar und wurde nahezu vollständig fragmentiert. Peak ⑥ repräsentiert das Mutter-Quasimolekülon nach Verlust eines 16:1-Fettaldehyds. Peak ⑦ kann durch die Abspaltung des *acyl*-Restes und Peak ⑧ durch den Verlust eines Wassermoleküls erklärt werden (Abb. 29, B). Anhand der Fragmentierungsanalysen konnte dieses Mutter-[M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>-Quasimolekülon mit  $m/z=612$  als 1Z-*alkenyl-acyl-glycerol* (0-16:1 / [U-<sup>13</sup>C]-18:2) identifiziert werden. Dieses Diradylglycerol (DRG) ist aus einem 16:1-Fettaldehyd und eines aus dem Supplementierungsmedium metabolisch aufgenommenen, einheitlich [<sup>13</sup>C]-markierten Moleküls Octadecadiensäure aufgebaut. Bei allen untersuchten Individuen ( $n=3$ ) und in unterschiedlichen Ejakulaten des gleichen Individuums ( $n=2$ ) ließen sich die hier gezeigten Fragmentierungsmuster reproduzieren.

Zusammenfassend konnte der bereits durch MALDI-TOF-MS nachgewiesene metabolische Einbau von chemisch supplementierter Octadecadiensäure in DAG mittels Q-TOF-MS-Fragmentierungsanalysen verifiziert werden. Alle kombinatorischen Möglichkeiten der theoretisch vorkommenden Quasimolekülon-Massen wurden berechnet und in einer Datenbank zusammengestellt. Das Vorgehen bei der Identifizierung von DAG (34:1) wurde am Beispiel von DAG (16:0 / 18:1) exemplarisch dargestellt. Das unbekannte Lipid, welches in den radiochemischen Experimenten detektiert wurde, konnte anhand seines spezifischen Fragmentierungsmusters als DRG (0-16:1 / [U-<sup>13</sup>C]-18:2) identifiziert werden.

#### **4.3.6 Analyse der Spezifität für den Einbau von Fettsäuren in 1,2-DAG mittels MALDI-TOF-MS**

Die vorangegangenen Untersuchungen der Hauptlipidklassen porciner *Spermatozoen* auf ihre Fettsäurezusammensetzung sowie massenspektrometrischen Analysen der Lipide haben gezeigt, dass Octadecadiensäure endogen vorkommt und als Substrat für die Lipidsynthese akzeptiert wird. Die chemische Supplementierung porciner *Spermatozoen* mit den verschiedenen Fettsäuren stellt neben der genetischen Supplementierung eine Möglichkeit zur Aufklärung der Substratspezifität dar. Für die Untersuchung der metabolischen Aufnahme von verschiedenen Fettsäuren in die neutralen Lipide porciner *Spermatozoen* wurde eine chemische Supplementierung mit den endogen vorkommenden Fettsäuren: Hexadecen-, Octadecen-, Octadecadien- und Octadecatriensäure durchgeführt. Zusätzlich wurde der metabolische Einbau der in porcinen Spermatozoenlipiden nicht vorkommenden Eicosapentaensäure untersucht. Die Supplementierungsbedingungen wurden für alle in diesem Experiment untersuchten Fettsäuren wie in Kapitel 4.3.4 für Octadecadiensäure beschrieben, gewählt. Als Kontrolle aller Varianten diente eine nicht supplementierte Probe. Die chemische Supplementierung erfolgte in jeder Probe proteinvermittelt. Die Endkonzentrationen der jeweiligen Fettsäuren betrug 39 µM und die Endkonzentration des Rinderserumalbumins 17 µM. Für die Inkubation wurden  $2 \times 10^9$  porcine *Spermatozoen* in 90 ml BTS-Medium aufgenommen, mit der jeweiligen Fettsäure versetzt und 48 Stunden bei 17°C inkubiert. Anschließend wurden die neutralen Lipide präparativ über Dünnschichtchromatographie aufgereinigt und mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Die Massenspektren verschiedener Proben sind in Abbildung 30 dargestellt.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 30: Identifizierung verschiedener Diacylglycerol-Spezies von flüssigkonservierten, porcinen Spermatozoen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

**A.** ohne Supplementierung; Supplementierungen mit: **B.** Hexadecensäure **C.** Octadecensäure **D.** Octadecadiensäure **E.** Octadecatriensäure **F.** Eicosapentaensäure; MALDI-TOF-Massenspektren neutraler Lipide, positive Ionendetektion

Der vergrößerte Ausschnitt des Massenspektrums zeigt die detektierten  $[M+Na]^+$ -Quasimolekülonen von DAG porciner Spermatozoen.

Neutrale Lipide wurden präparativ über Dünnschichtchromatographie aufgereinigt, positive Ionendetektion. Erläuterungen im Text; MALDI-MS-Bedingungen siehe 3.7.1

Alle in diesem Experiment erhaltenen MS-Signale konnten den  $[M+Na]^+$ -Quasimolekülonen von DAG (14:0 / 14:0), (14:0 / 16:0), (16:0 / 16:0) und (16:0 / 18:0) zugeordnet werden. Für alle Supplementierungsvarianten mit Ausnahme von Eicosapentaensäure, ließen sich in den Massenspektren jeweils charakteristische Peaks nachweisen. Diese sind in der Abbildung 30 als Peak ① bis Peak ④ markiert. Anhand der erstellten Datenbank (8.1.1) konnten diese vier detektierten, probenspezifischen Signale den jeweiligen  $[M+Na]^+$ -Quasimolekülonen von DAG zugeordnet werden. Diese sind DAG (16:1 / 16:1), (18:1 / 18:1), (18:2 / 18:2) und (18:3 / 18:3). Bei einer chemischen Supplementierung mit Eicosapentaensäure, ließ sich in den Lipiden porciner *Spermatozoen* kein probenspezifisches  $[M+Na]^+$ -Quasimolekülion mit  $m/z = 683.46$  von DAG (20:5 / 20:5) nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass Eicosapentaensäure nicht in die Spermatozoenlipide metabolisch eingebaut wird. Es ist jedoch unbekannt ob die Aufnahme dieser Säure in den freien Fettsäuren-Pool der Zellen, deren CoA-Aktivierung oder die Substratspezifität für die an der Reaktion beteiligten Enzyme verantwortlich ist.

Somit wurde in diesem Versuch gezeigt, dass endogen in den porcinen *Spermatozoen* vorkommenden Fettsäuren für die Biosynthese von DAG akzeptiert werden. Die chemische Supplementierung mit der endogen nicht vorkommenden Eicosapentaensäure führte zu keinem metabolischen Einbau in die DAG. Bei allen untersuchten Individuen ( $n=3$ ) sowie bei unterschiedlichen Ejakulaten des gleichen Individuums ( $n=1$ ) ließen sich die hier gezeigten Ergebnisse sicher reproduzieren.

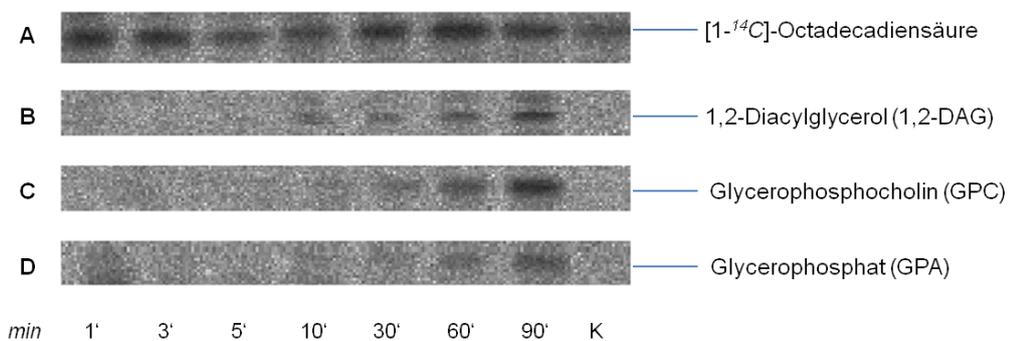
#### **4.4 Temperatur-, individuums- und seminalplasmaspezifische Einflüsse der metabolischen Aufnahme von Octadecadiensäure**

Die bisher in der Literatur beschriebenen Markierungsexperimente mit Fettsäuren wurden nur unter akrosom-reaktionsfördernden Bedingungen durchgeführt (Roldan and Harrison, 1990, 1992, 1993; Roldan et al., 1994; Vazquez and Roldan, 1997a, b; Zanetti et al., 2010b). In den vorangegangenen Untersuchungen unter Flüssigkonservierungsbedingungen wurde gezeigt, dass Octadecadiensäure in den porcinen *Spermatozoen* endogen vorkommt und als Substrat für die Lipidbiosynthese akzeptiert wird (4.2). Weiterhin wurde gezeigt, dass der metabolische Einbau dieser Fettsäure in 1,2-DAG und *diacyl*-GPC stattfindet und wahrscheinlich temperaturabhängig ist (4.3.3). In der Fachliteratur liegen *bis dato* keine Angaben über die Metabolisierung der Octadecadiensäure bei Säugetierspermatozoen vor. Der Einfluss der Menge des zur Verfügung stehenden Substrats, der Temperatur und der Einfluss des Seminalplasmas sowie individuelle Unterschiede sind ebenfalls in der Fachliteratur nicht beschrieben. Um den metabolischen Einbau der Octadecadiensäure in GPC und DAG detaillierter zu untersuchen, werden daher Markierungsexperimente durchgeführt. Desweiteren wird überprüft, ob die oben genannten Faktoren wie individuelle Unterschiede und temperaturabhängige Veränderungen die chemische Supplementierung beeinflussen. Zusätzlich soll eine mögliche Metabolisierung der Octadecadiensäure durch das Seminalplasma untersucht werden.

##### **4.4.1 Nachweis der metabolischen Aufnahme von Octadecadiensäure in *diacyl*-GPC / 1,2-DAG mittels [1-<sup>14</sup>C]-Kurzzeitmarkierung**

Für die genauere Untersuchung der metabolischen Aufnahme von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in die bereits identifizierten Lipidklassen (4.3.5) wurden Kurzzeitmarkierungsexperimente durchgeführt. Zum einen wurde die Aufnahme der Radiochemikalie in den freien Fettsäure Pool (FFS-Pool) der porcinen *Spermatozoen* analysiert, zum anderen wurde untersucht, ob bei der metabolischen Aufnahme ein Einbau in 1,2-DAG oder *diacyl*-GPC präferiert wird. Dazu wurden  $1,33 \times 10^9$  porcine *Spermatozoen* in 60 ml BTS-Medium mit dem Isotopengemisch über einen Zeitraum von 1 min bis 90 min bei RT markiert.

Die Endkonzentration des [ $^{12}\text{C}$ ] / [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Isotopengemisches betrug  $39\ \mu\text{M}$  und die eingesetzte Aktivität  $4,67\ \mu\text{Ci}$ , was einer radioaktive Menge von  $0,58\ \mu\text{Ci} / \text{Probe}$  entsprach. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden je  $7,5\ \text{ml}$  des Markierungsansatzes abgenommen und die Reaktion durch Kochlyse gestoppt. Um sowohl den unspezifischen, nicht enzymatischen, metabolischen Einbau der Radiochemikalie in die bereits vorhandenen Spermatozoenlipide, als auch die eventuelle Entstehung von Artefakten durch das Flüssigkonservierungsmedium auszuschließen, wurde eine Kontrolluntersuchung durchgeführt. Hierfür wurden ebenfalls  $7,5\ \text{ml}$  des gleichen Markierungsansatzes abgenommen und die *Spermatozoen* noch vor der Markierung durch Kochlyse avitalisiert. Die 90-minütige Inkubation dieser Kontrollprobe erfolgte ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen. Bei allen Proben wurde dann eine Gesamtlipidextraktion durchgeführt (3.6.1). Die Lipide wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (3.6.2) und anschließend mittels Autoradiographie visualisiert (3.9.4). Die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen erfolgte wie im Kapitel 4.3.3 beschrieben. In der Abbildung 31 sind nur die Autoradiogrammbereiche der von dem metabolischen Einbau betroffenen Lipidklassen dargestellt.



**Abbildung 31: Einbau von [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure in die Lipide porciner *Spermatozoen* nach Kurzzeitmarkierung**

Es sind Autoradiogramme der dünnschichtchromatographischen Auftrennung dargestellt.

**A.** Aufnahme von [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Octadecadiensäure in den freien Fettsäure Pool;

Metabolischer Einbau in:

**B.** 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG); **C.** *diacyl*-Glycerophosphocholin (*diacyl*-GPC); **D.** Glycerophosphat;

Markierungsdauer 1 min bis 90 min, RT; Kontrollprobe (K): Untersuchung des unspezifischen Einbaus und Artefaktbildung, Markierungsdauer: 90 min, RT;

Nach der jeweiligen Inkubation wurden die *Spermatozoen* kochlysiert, gewaschen und die Lipide extrahiert (3.6.1). Danach erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie die Auftrennung polarer und neutraler Lipide (3.6.2). Anschließend wurden die Platten autoradiographiert (3.9.4) und radioaktive Lipide mit Hilfe von Referenzlipiden den jeweiligen Lipidklassen zugeordnet (3.9.5). Dünnschichtchromatographische Auftrennung erfolgte:

(A, B) in Chloroform / Methanol /  $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4)

(C, D) in *n*-Hexan / Diethylether / Eisessig (80:15:1); DC-Platten:  $\text{Si}_{250}$  PA 7003-04, J.T. Baker.

Unten den in diesem Experiment gewählten Bedingungen fand eine Aufnahme von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in den freien Fettsäure-Pool (FFS-Pool) der vitalen, porcinen *Spermatozoen* statt (Abb. 31, A). Bei der Kontrollprobe ist ebenfalls ein Signal allerdings mit deutlich geringerer Intensität zu verzeichnen. Es ist bekannt, dass bei den somatischen Zellen neben der aktiven Aufnahme von Fettsäuren auch ein passiver Transport in die Zellen erfolgen kann. Die in die Zellen aufgenommenen freien Fettsäuren können entweder direkt durch Coenzym-A (Co-A) aktiviert und anschließend metabolisiert werden oder zuvor kann eine Bindung an ein Membran-assoziiertes Protein (FABP, *fatty acid-binding protein*) erfolgen mit anschließender Aktivierung und Metabolisierung (Schwenk et al., 2010). Um die von den *Spermatozoen* nicht aufgenommene Radiochemikalie zu entfernen, wurden wiederholte Waschvorgänge durchgeführt (3.6.1). Die Zunahme der detektierten Signalintensität der Radiochemikalie steht in einem direkten Zusammenhang mit der Inkubationsdauer. Dies deutet darauf hin, dass eine fortlaufende Aufnahme der Radiochemikalie in den FFS-Pool porciner *Spermatozoen* erfolgt. Die metabolische Aufnahme der [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG), *diacyl*-Glycerophosphocholin (*diacyl*-GPC) und Glycerophosphat (GPA) zeigt ebenfalls eine enge Korrelation mit der Inkubationsdauer (Abb. 31, B-D). Bereits nach 10 min Inkubation wurden bei den vom metabolischen Einbau der Radiochemikalie betroffenen Lipidklassen ersten Signale detektiert. Diese sind mit annähernd gleichen Intensitäten vertreten und steigen im Verlauf des gesamten Experimentes bei DAG, GPC und GPA im gleichen Ausmaß an. Bei der Kontrollprobe (K) mit invitalen *Spermatozoen* wurde auch nach der längsten in diesem Versuch angewendeten Inkubationsdauer von 90 min keine metabolische Aufnahme in die hier untersuchten Lipidklassen nachgewiesen. Somit kann sowohl eine Artefaktbildung als auch ein unspezifischer, nicht enzymatischer Einbau der Radiochemikalie in bereits vorhandene *Spermatozoenlipide* ausgeschlossen werden. In den bereits durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen mit stabilen Isotopen wurde gezeigt, dass die metabolische Aufnahme der Octadecadiensäure unter anderem in *diacyl*-GPC und in 1,2-DAG stattfindet (4.3.5). Da sowohl nur eine, als auch zwei aus dem Supplementierungsmedium stammenden [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäuren in diese Lipidklassen metabolisch eingebaut werden können, ist hier nur eine relative Quantifizierung der in die Lipide aufgenommenen Radiochemikalie möglich (4.3.5.1, 4.3.5.2). Die Menge der metabolisch

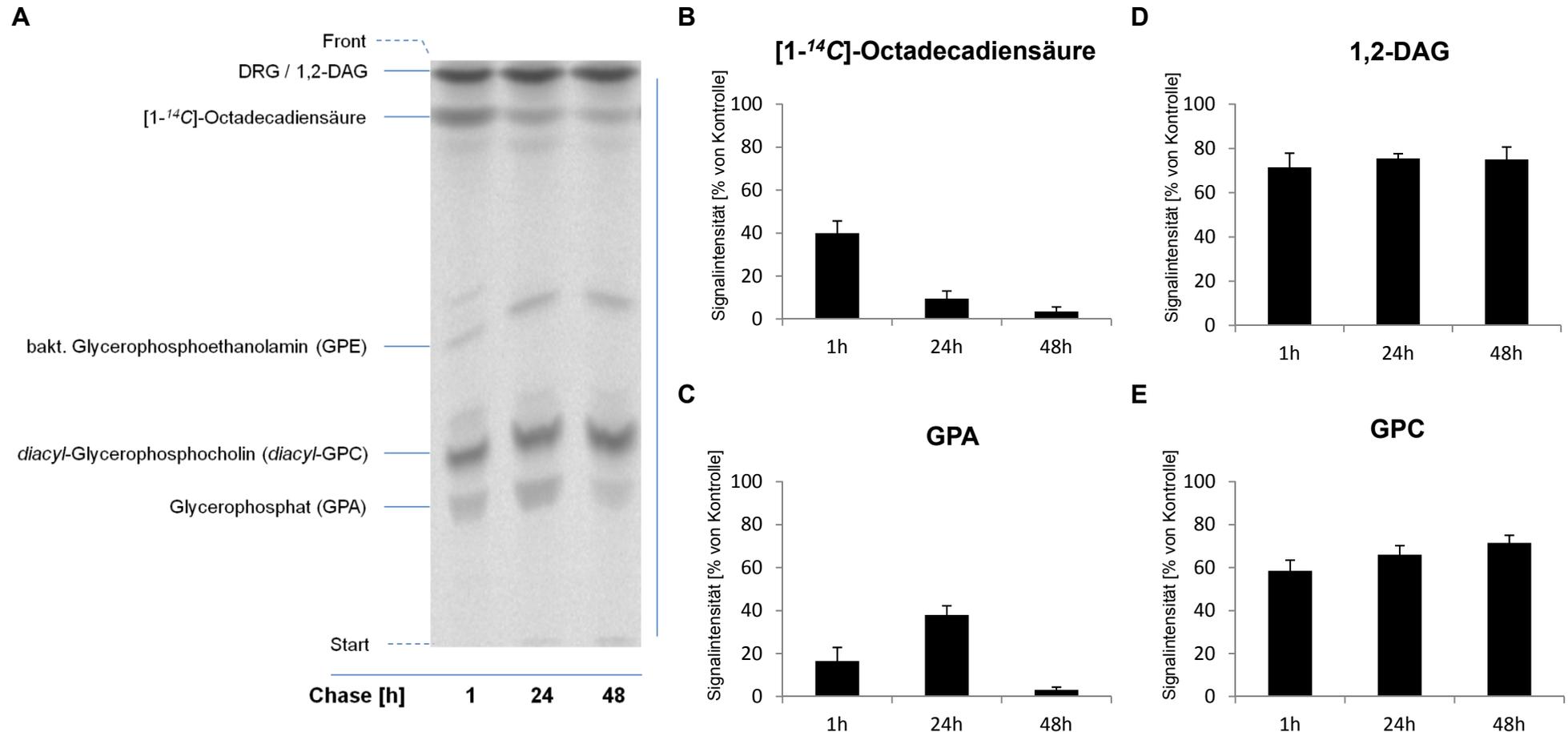
aufgenommenen [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure liegt in allen dargestellten Lipidklassen beim jeweiligen Untersuchungszeitpunkt (10 min bis 90 min) im Gleichgewicht vor.

Zusammenfassend wurde in diesem Experiment festgestellt, dass nach einer Kurzzeitmarkierung kein präferierter metabolischer Einbau der Radiochemikalie in eine bestimmte Lipidklasse stattfindet. Desweiteren konnte ein unspezifischer, nicht enzymatischer Einbau der Radiochemikalie in bereits vorhandene Spermatozoenlipide ausgeschlossen werden.

#### **4.4.2 „Pulse-Chase“ - Untersuchungen der metabolischen Aufnahme von Octadecadiensäure**

In den folgenden Experimenten wurde die metabolische Aufnahme von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure über einen Zeitraum von bis zu 48 h untersucht. Das im folgenden angewendete *Pulse-Chase*-Experiment unterscheidet sich von den vorangegangenen Experimenten dadurch, dass die Radiochemikalie nur für einen kurzen Zeitraum den porcinen *Spermatozoen* zur Verfügung gestellt wird („Puls“). Anschließend werden diese von den Resten der Radiochemikalie befreit und weiter inkubiert („Chase“). Dies ermöglicht somit eine detaillierte Untersuchung des Fettsäuremetabolismus. Bei den *Puls-Chase*-Experimenten wurden  $6,6 \times 10^8$  in 30 ml BTS-Medium flüssigkonservierte, porcine *Spermatozoen* mit [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure markiert. Die Dauer der Pulsmarkierungen betrug 3 min bis 30 min. Die eingesetzte Aktivität betrug 5  $\mu$ Ci. Um eine Detektion nach einem sehr kurzen Puls zu ermöglichen, wurde bei diesen Untersuchungen die Radiochemikalie unverdünnt und nicht wie im vorangegangenen Experiment als [<sup>12</sup>C / 1-<sup>14</sup>C]-Isotopengemisch eingesetzt. Anschließend wurden die *Spermatozoen* mit BTS-Medium von den Resten der Radiochemikalie befreit. Die anschließende Inkubation („Chase“) wurde bei 17°C durchgeführt. Die Analyse der metabolischen Aufnahme der Radiochemikalie erfolgte nach 1 h, 24 h und 48 h. Die Details der Lipidextraktion und Quantifizierung sind dem Kapitel 4.4.1 zu entnehmen. Da bei den verschiedenen Pulsmarkierungen bezüglich der metabolischen Aufnahme der Radiochemikalie in die Lipide nur geringfügige Unterschiede zu verzeichnen waren, wird in der folgenden Auswertung nur die Puls-Markierung (30 min) exemplarisch dargestellt.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 32: Auswirkungen unterschiedlicher Chase-Zeiträume auf den Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in die Lipide porciner Spermatozoen**

**A.** Autoradiogramm der dünnschichtchromatographischen Auftrennung;

**B-E:** Relative, densitometrische Quantifizierung der metabolisch aufgenommenen [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in die Lipide porciner Spermatozoen

*Puls*-Dauer: 30 min bei 17°C; *Chase*-Dauer: 1 h, 24 h, 48 h bei 17°C;

Nach der jeweiligen Inkubation wurden die *Spermatozoen* gewaschen, kochlysiert und die Lipide extrahiert (3.6.1). Danach erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie die Auftrennung der Lipide (3.6.2). Die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen wurde mit Hilfe von Referenzlipiden durchgeführt (3.9.5). Anschließend wurden die Platten autoradiographiert (3.9.4) und die radioaktiven Lipide densitometrisch quantifiziert (3.9.5, 3.9.7). Die DC-Auftrennung erfolgte in Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O (65:25:4); DC-Platten: SI<sub>250</sub> PA 7003-04, J.T. Baker.

Bei der Auswertung des Autoradiogramms wurde die in den freien Fettsäure-Pool der porcinen *Spermatozoen* aufgenommene [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure detektiert (Abb. 32, B). Im Verlauf des Experiments ist die Abnahme der Signalintensität der freien Radiochemikalie bei gleichzeitiger Zunahme der Signalintensität bei den untersuchten Lipidklassen offensichtlich. Somit findet ein metabolischer Einbau sowohl in die neutralen Lipide (DRG / 1,2-DAG) als auch in die polaren Lipide (GPC und GPA) statt. Bei den Untersuchungen der neutralen Lipide (4.3.3) wurde gezeigt, dass die metabolische Aufnahme hauptsächlich in 1,2-DAG und nur in wesentlich geringeren Mengen in DRG (1Z-*alkenyl-acyl*-glycerol, (0-16:1 / 18:2)) stattfindet. Daher wird in den folgenden Auswertungen nur 1,2-DAG berücksichtigt.

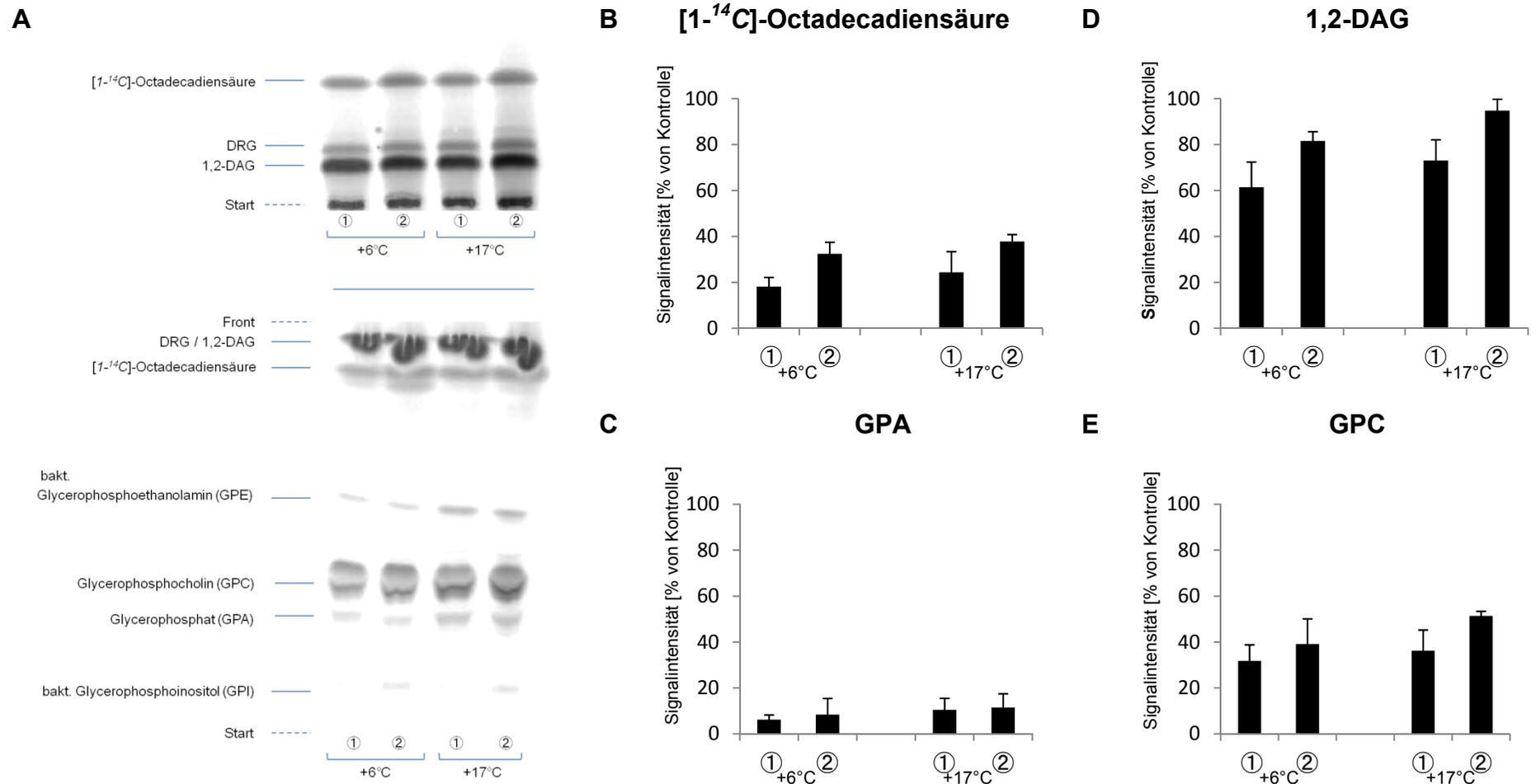
Bei der densitometrischen Auswertung wurde gezeigt, dass die relative Verteilung der Signalintensitäten bei 1,2-DAG und *diacyl*-GPC zu allen Untersuchungszeitpunkten annähernd gleich ist. Die Menge der metabolisch aufgenommenen [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure liegt somit in diesen Lipidklassen im Gleichgewicht vor. Die Signalintensität von GPA nimmt im Verlauf der *Puls-Chase*-Experimente ab. Bei der GPC-Biosynthese wird zuerst GPA zu 1,2-DAG und anschließend zu GPC umgewandelt (Gurr et al., 2002). Daher korreliert die Abnahme der Signalintensität von GPA mit der Zunahme der Signalintensität von *diacyl*-GPC und DAG. Desweiteren wurde die metabolische Aufnahme in das bereits identifizierte, bakterielle GPE detektiert (4.3.2). Somit lag hier eine geringfügige bakterielle Kontamination des Ejakulates vor. Der Einfluss der Temperatur sowie der Inkubationsdauer auf die metabolische Aufnahme von Octadecadiensäure in Lipide der Bakterien werden in der anschließenden Langzeitmarkierung näher untersucht (4.4.3).

Zusammenfassend wurde in diesem *Puls-Chase*-Experiment gezeigt, dass die Octadecadiensäure in den freien Fettsäure Pool der *Spermatozoen* aufgenommen und anschließend metabolisch in die Lipide eingebaut wird. Im Unterschied zu den vorangegangenen Kurzzeitmarkierungen konnte in diesen *Puls-Chase*-Experimenten gezeigt werden, dass die in den FFS-Pool aufgenommene Octadecadiensäure nahezu vollständig für die Lipidbiosynthese von 1,2-DAG und GPC verwendet wird.

#### 4.4.3 Temperatur- und individuumsspezifische Einflüsse auf die metabolische Aufnahme von Octadecadiensäure

Bei der folgenden Langzeitmarkierung mit [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure wurden zum einen der Einfluss der Temperatur und zum anderen die individuumsspezifischen Unterschiede bei der metabolische Aufnahme von Octadecadiensäure in die Lipide porciner *Spermatozoen* untersucht. Dazu wurden je  $1,33 \times 10^9$  porcine *Spermatozoen* von zwei unterschiedlichen Individuen der gleichen porcinen Rasse (Piétrain), die bei gleichen Bedingungen gehalten wurden, analysiert. Die *Spermatozoen* wurden in 60 ml BTS-Medium aufgenommen und mit dem [<sup>12</sup>C] / [1-<sup>14</sup>C]-Isotopengemisch über einen Zeitraum von 48 h bei 6°C oder bei 17°C markiert. Im Gegensatz zu den *Puls-Chase*-Experimenten wurde die Radiochemikalie zum einem als Isotopengemisch und zum anderen über den gesamten Versuchszeitraum zugesetzt. Die Anfangskonzentration des Octadecadiensäuregemisches betrug 39 µM und die eingesetzte Aktivität betrug 8,6 µCi, was einer radioaktiven Menge von 2,87 µCi / Probe entspricht. Die Gesamtlipidextraktion, die dünnschichtchromatographische Auftrennung und die anschließende Analyse erfolgten wie bereits in Kapitel 4.4.1 beschrieben. Eine genaue Quantifizierung der radioaktiv-markierten Lipide zueinander ist nicht möglich, da sowohl nur eine als auch zwei aus dem Supplementierungsmedium stammende [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäuren in diese Lipidklassen metabolisch eingebaut werden können (4.3.5). In der Abbildung 33 sind die Autoradiogramme und die relative densitometrische Quantifizierung der metabolisch eingebauten Radiochemikalie in die Spermatozoenlipide und in die bakteriellen Lipide dargestellt.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 33: Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in die Lipide porciner Spermatozoen nach Langzeitmarkierung bei 6°C und 17°C**

Probe ①: flüssigkonservierte Probe von Individuum 1; Probe ②: flüssigkonservierte Probe von Individuum 2; Markierungsdauer 48 h Std bei 6° oder bei 17°C;

**A.** Autoradiogramm der dünnenschichtchromatographischen Auftrennung;

**B.** Relative, densitometrische Quantifizierung der in den FFS-Pool porciner Spermatozoen aufgenommenen [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure;

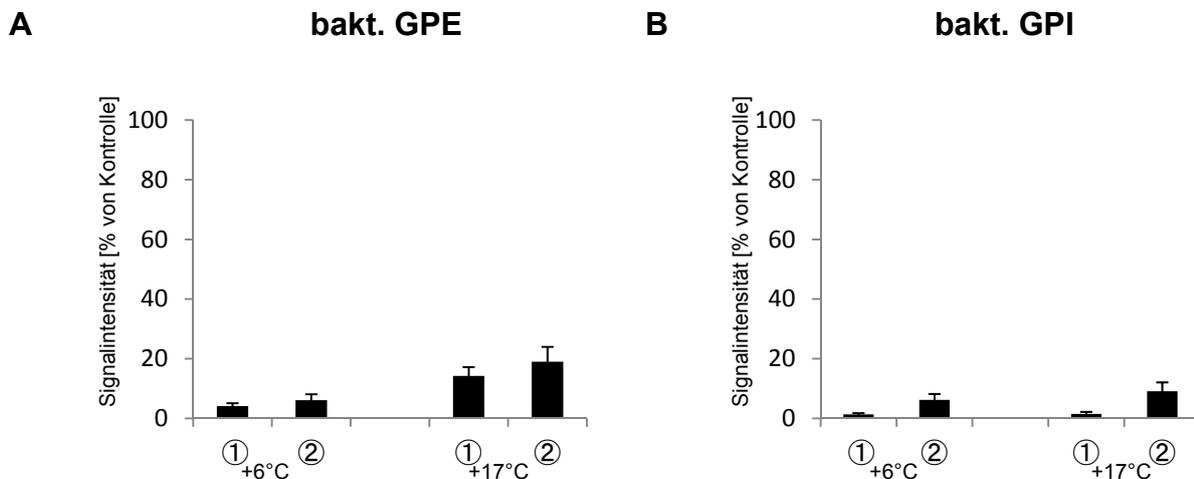
Metabolischer Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in: **C.** 1,2-Diacylglycerol (1,2-DAG); **D.** diacyl-Glycerophosphocholin (diacyl-GPC); **E.** Glycerophosphat (GPA); Metabolischer Einbau in die bakterielle Lipide siehe Details in Abbildung 34. Proben Vorbereitung siehe Text; DC-Auftrennung erfolgte für (B, C) in *n*-Hexan / Diethylether / Eisessig (80:15:1) und für (D, E) in Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O (65:25:4); jeweils DC-Platten: SI<sub>250</sub> PA 7003-04, J.T. Baker.

Bei der Auswertung der Autoradiogramme wurde die in den freien Fettsäure-Pool (FFS-Pool) porciner *Spermatozoen* aufgenommene [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure detektiert (Abb. 33, B). Die Menge der aufgenommenen Radiochemikalie ist bei Individuum 2 sowohl bei 6°C als auch bei 17°C Flüssigkonservierung verglichen mit Individuum 1 erhöht. Bei beiden Individuen ist bei 17°C eine verstärkte Aufnahme der Radiochemikalie zu verzeichnen. Die Lagerungstemperatur hat somit einen Einfluss auf die Aufnahme der Octadecadiensäure in den FFS-Pool porciner *Spermatozoen*. Bei den untersuchten Lipidklassen GPA, 1,2-DAG und GPC wurde ebenfalls bei 17°C bei beiden Individuen ein verstärkter metabolischer Einbau beobachtet. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in diesem Experiment als Vorstufe bei der Biosynthese dieser Lipidklassen verwendet wird (Gurr et al., 2002). Somit korreliert die erhöhte Aufnahmerate der Radiochemikalie in die porcinen *Spermatozoen* mit dem anschließenden ebenfalls erhöhten metabolischen Einbau in die Lipide. Ein wie im vorangegangenen *Puls-Chase*-Experiment festgestellter GPA-Verbrauch wurde bei diesem Experiment aufgrund der kontinuierlich vorhandenen Radiochemikalie nicht detektiert. Die Menge der in GPC und 1,2-DAG metabolisch aufgenommenen Radiochemikalie lag hier ebenfalls nicht im Gleichgewicht vor. Die Signalintensität der Radiochemikalie ist bei der durchgeführten Langzeitmarkierung von 1,2-DAG verglichen mit GPC hingegen etwa zweifach erhöht. Es wurde kein Einfluss der Inkubationstemperatur auf dieses Verhältnis festgestellt. Die genauen Ursachen für den hier gezeigten präferierten Einbau in 1,2-DAG bei dauerhaft vorliegender Octadecadiensäure als Substrat, sind unbekannt. Es kann jedoch angenommen werden, dass entweder eine negative Rückkopplung für die bei den metabolischen Prozessen beteiligten Enzymen existiert oder dass die Quelle an Cholin-Phosphat erschöpft wurde, und somit keine für die GPC-Biosynthese essentiellen Kopfgruppen mehr vorhanden sind. Ob bei der chemischen Supplementierung mit anderen Fettsäuren ein ähnlich präferierter Einbau in die Lipide porciner *Spermatozoen* stattfindet, sollte in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

Bei den Spermatozoenproben von Individuum 1 und Individuum 2 wurden temperaturunabhängige Unterschiede festgestellt. Sowohl die Aufnahme der Radiochemikalie in den FFS-Pool als auch der metabolischen Einbau in die Lipide war bei Individuum 2 erhöht. Eine mögliche Erklärung hierfür können individuums-

oder ejakulatspezifische Besonderheiten sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass bei den untersuchten Proben von Individuum 2 mehr vitale und somit zum Stoffwechsel befähigte *Spermatozoen* vorlagen. Die Zellzahl der *Spermatozoen* in den Proben ( $2,2 \times 10^7$  /ml) wird durch die Anzahl der motilen *Spermatozoen* definiert (3.4). Da die Motilität nur eine von mehreren physiologischen Kriterien ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass als immotil eingestufte *Spermatozoen* trotzdem eine metabolische Aktivität aufweisen und somit sowohl zur Aufnahme von Fettsäuren als auch zur Lipidbiosynthese befähigt sind. Berichte über die Lipidbiosynthese immotiler *Spermatozoen* liegen jedoch *bis dato* in der Fachliteratur nicht vor.

Bei beiden untersuchten Individuen ist ebenfalls eine metabolische Aufnahme der Radiochemikalie in die bereits identifizierten bakteriellen Lipide GPE und GPI nachweisbar (4.3.2, Abbildung 33 A). Die relative densitometrische Quantifizierung dieser radioaktiv markierten Lipide ist in Abbildung 34 dargestellt. Die folgende Diskussion bezieht sich ausschließlich auf bakterielles GPE und bakterielles GPI.



**Abbildung 34: Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in bakterielles GPE und GPI nach Langzeitmarkierung bei 6°C und bei 17°C**

Probe ①: flüssigkonservierte Proben von Individuum 1; Probe ②: flüssigkonservierte Proben von Individuum 2; Markierungsdauer 48 h bei 6° und 17°C

Metabolischer Einbau von [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure in: **A.** Glycerophosphoethanolamin (bakt. GPE), **B.** Glycerophosphoinositol (bakt. GPI); Metabolische Aufnahme der Radiochemikalie in bakterielle Lipide ist in Kapitel 4.3.2 beschrieben; Probenvorbereitung siehe Text.

In den flüssigkonservierten Proben von Individuum 1 ist die metabolische Aufnahme der Radiochemikalie nur in GPE nachweisbar. Bei Individuum 2 ist die Aufnahme sowohl in GPE als auch GPI zu verzeichnen. Diese probenspezifischen Besonderheiten weisen darauf hin, dass beide Proben mit unterschiedlichen

Bakterien kontaminiert sein könnten (4.3.2). Es ist bekannt, dass beispielsweise *E.coli* GPE, aber nicht GPI synthetisieren kann (O'Leary and Wilkinson, 1988; Wilkinson, 1988). Mykobakterien können jedoch sowohl GPE als auch GPI synthetisieren (Morita et al., 2011). Es wurden zusätzliche Analysen dieser Proben unter gleichen Bedingungen jedoch in einem gentamycinhaltigem BTS-Flüssigkonservierungsmedium mit avitalisierten *Spermatozoen* (4.3.2) durchgeführt. Hierbei wurde ebenfalls die Aufnahmen der Radiochemikalie in bakterielles GPE und bakterielles GPI mit gleichen Signalintensitäten detektiert (Daten hier nicht gezeigt). Somit führte der gesetzlich vorgeschriebene Antibiotikazusatz (544 µM / Probe, Richtlinie: 90/429/EWG vom 26. Juni 1990) nicht zu einer Verringerung der bakteriellen Kontamination und es konnte davon ausgegangen werden, dass diese Bakterienstämme eine Gentamycinresistenz aufweisen. Das Vorkommen von antibiotikaresistenten und multiresistenten Bakterienstämmen in porcinen Ejakulaten wurde in der Fachliteratur bereits ausführlich beschrieben (Althouse and Lu, 2005; Althouse et al., 2008).

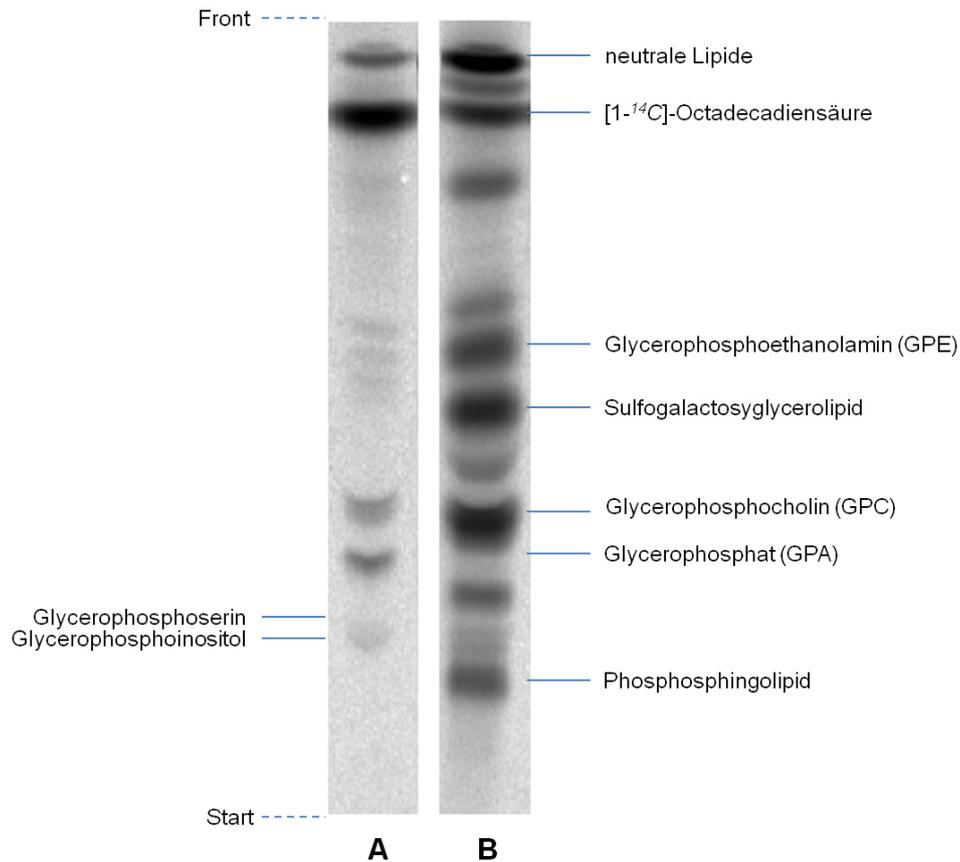
Bei der densitometrischen Auswertung der radioaktiv markierten Lipide GPE und GPI in der Abbildung 34 wurde gezeigt, dass die metabolische Aufnahme der Radiochemikalie in die untersuchten bakteriellen Lipidklassen temperaturabhängig ist. Bei Niedrigtemperaturlagerung (6°C) ist die Signalstärke verglichen mit der gängigen Flüssigkonservierungstemperatur (17°C) um etwa 70% reduziert. Die porcinen Ejakulate sind vor allem durch mesophile Bakterienarten kontaminiert (Schulze, 2010). Die Niedrigtemperaturlagerung führt bei diesen Bakterienarten sowohl zu einer Verringerung ihrer Stoffwechselaktivität als auch zu einer Zunahme des Generationsintervalls (Scherer and Neuhaus, 2006). Somit kann durch das Absenken der Lagerungstemperatur eine Reduktion der Keimzahl erreicht werden.

Zusammenfassend wurde bei dieser Langzeitmarkierung gezeigt, dass die metabolische Aufnahme von Octadecadiensäure sowohl in die Lipide porciner *Spermatozoen* als auch in die bakteriellen Lipide temperaturabhängig ist. Es findet ein präferierter metabolischer Einbau der Radiochemikalie in 1,2-DAG statt. Individuums- bzw. ejakulatspezifische Unterschiede wurden beobachtet und werden in den nachfolgenden Untersuchungen dargestellt. Durch die

Niedrigtemperaturlagerung kann eine Reduktion der bakteriellen Kontamination erreicht werden.

#### **4.4.4 Seminalplasma-spezifische Einflüsse auf die metabolische Aufnahme von Octadecadiensäure in die Lipide**

Bei der Ejakulation werden die *Spermatozoen* mit dem Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, dem Seminalplasma, vermischt. Das native Ejakulat besteht somit aus diesem Sekret und den *Spermatozoen*. Das Seminalplasma beeinflusst sowohl die physiologischen Parameter der *Spermatozoen* als auch den gesamten Reproduktionsvorgang (1.2). Durch den Vergleich von flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen* und nativem porcinen Ejakulat nach chemischer Supplementierung sollte die metabolische Aufnahme der Octadecadiensäure in die Lipide des Seminalplasmas näher untersucht werden. Für die Analyse der flüssigkonservierten *Spermatozoen* wurden  $6,6 \times 10^8$  Zellen (1 ml des nativen Ejakulats) eines Individuums der Rasse Piétrain gewaschen und in 30 ml BTS-Medium aufgenommen. Diese Probe A war somit nahezu seminalplasmafrei. Die Analyse des nativen Ejakulats (1,5 ml) erfolgte ohne Zugabe des BTS-Mediums (Probe B). Die Markierung und Probenvorbereitung wurde wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, durchgeführt. In der Abbildung 35 sind die Autoradiogramme beider Proben nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung des Gesamtlipidextraktes dargestellt.



**Abbildung 35: Vergleich des metabolischen Einbaus von  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure in die Lipide flüssigkonservierter, porciner Spermatozoen und in natives porcines Ejakulat**

Es sind Autoradiogramme der dünnschichtchromatographischen Auftrennung dargestellt:

**A.** Flüssigkonservierte porcine Spermatozoen; **B.** natives Ejakulat des gleichen Individuums; Markierungsdauer: 3 h, RT; Spermatozoen aus einem nativen Ejakulat wurden gewaschen, flüssigkonserviert und anschließend mit der Radiochemikalie markiert (A); Natives Ejakulat porciner Spermatozoen wurde mit der Radiochemikalie markiert (B); Nach der Gesamtlipidextraktion erfolgte die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Gesamtlipidextrakte in Chloroform / Methanol /  $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4); DC-Platten:  $\text{Si}_{250}$  PA 7003-04, J.T. Baker. Die Zuordnung zu den jeweiligen Lipidklassen erfolgte anhand der  $R_f$ -Werte von Referenzsubstanzen.

Bei der Betrachtung der Autoradiogramme sind probenspezifische Signale der metabolisch in den Lipiden eingebauten Radiochemikalie zu erkennen. Die metabolische Aufnahme in die Lipide der flüssigkonservierten porcinen Spermatozoen (Probe A) wurde bereits ausführlich in den Kapiteln 4.3.3 und 4.4.1 beschrieben. Bei Probe B sind zusätzlich weitere Lipidklassen von der Aufnahme der  $[1-^{14}\text{C}]$ -Octadecadiensäure betroffen. Dies sind sowohl polare als auch neutrale Lipide. Die Signalintensität ist in dieser Probe zusätzlich deutlich erhöht. Dies kann dadurch erklärt werden, dass in der Probe mit dem nativen Ejakulat mehr Spermatozoen vorlagen.

Da bei der Auswertung der Autoradiogramme bei beiden Proben jedoch unterschiedliche Lipidklassen vom Einbau der Radiochemikalie betroffen sind, kann davon ausgegangen werden, dass zusätzlich die Bestandteile des Seminalplasmas eine metabolische Aktivität aufweisen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine starke bakterielle Kontamination des nativen Ejakulats in Probe B. Dies würde jedoch zu einer Agglutination der *Spermatozoen* führen (Kaur et al., 2010; Monga and Roberts, 1994). Bei den mikroskopischen Analysen wurde keine Agglutination der *Spermatozoen* beobachtet und somit kann die bakterielle Kontamination als Ursache für das unterschiedliche Markierungsmuster beider Proben ausgeschlossen werden. Diese Annahme wird durch die vorangegangenen Untersuchungen der bakteriellen Kontamination von flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen* gestützt. Dort wurde gezeigt, dass die Aufnahme der Radiochemikalie bei Bakterien vor allem in die Lipidklassen GPE und GPI stattfindet (4.3.2). Da hier jedoch weitere radioaktiv-markierte Lipidklassen detektiert wurden, kann von einer Metabolisierung der Radiochemikalie durch die Komponenten des Seminalplasmas ausgegangen werden. Die ejakulatsspezifische und individuumsspezifische Zusammensetzung des Seminalplasmas und das Gesamtvolumen des Ejakulats sind von zahlreichen Faktoren, wie beispielsweise von dem Gesundheitszustand und der Ernährung abhängig und unterliegen zusätzlich noch saisonalen Schwankungen. In diesem Experiment wurde daher nur exemplarisch der Einfluss der chemischen Supplementierung mit Octadecadiensäure auf das Seminalplasma eines Individuums untersucht.

#### **4.5 Physiologische Auswirkungen der chemischen Supplementierung mit Fettsäuren auf porcine *Spermatozoen***

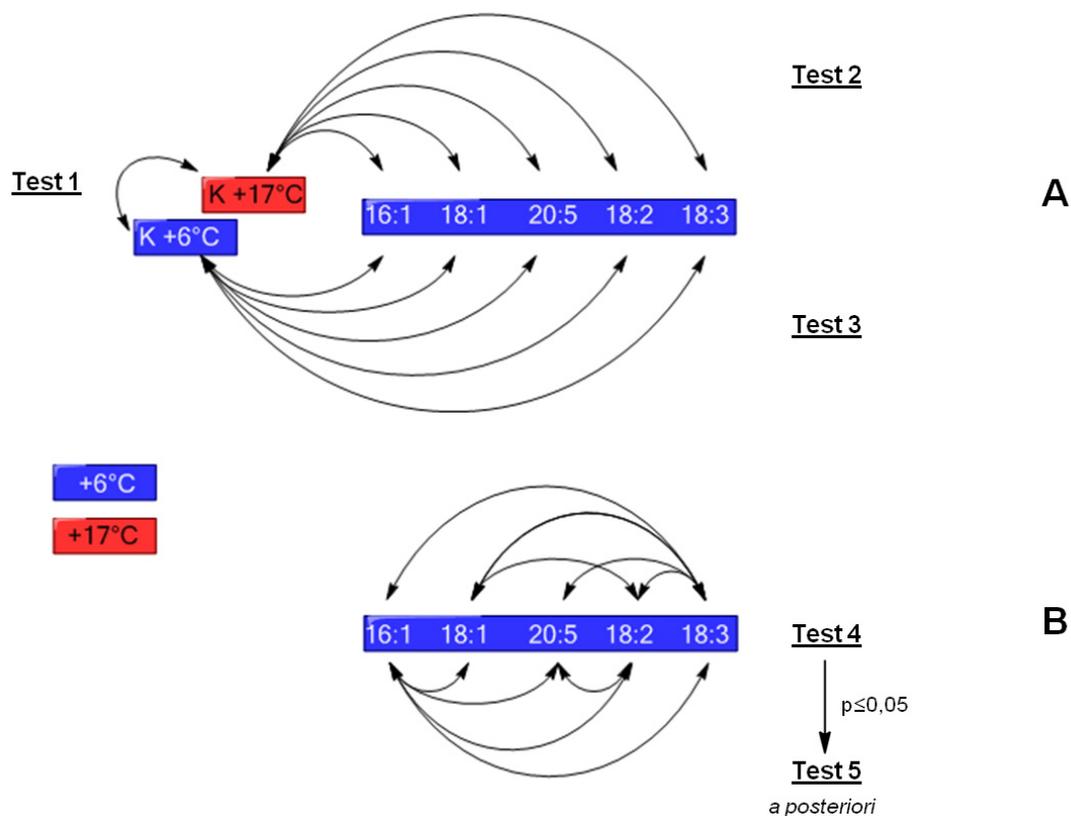
In diesem Teil der Arbeit wurde die Auswirkung der chemischen Supplementierung auf die physiologischen Parameter bei flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen* untersucht. In zahlreichen Arbeiten wurden sowohl die metabolische Aufnahme von Fettsäuren als auch die Veränderung der Lipidzusammensetzung von Säugetierspermatozoen unter akrosom-reaktionsfördernden Bedingungen untersucht (Roldan and Harrison, 1990, 1992, 1993; Roldan et al., 1994; Vazquez and Roldan, 1997a, b; Zanetti et al., 2010b). Daten über physiologische Veränderungen bei niedrigtemperaturgelagerten, flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen*, wie beispielweise die Beeinflussung der Motilität durch die metabolische Aufnahme von Fettsäuren in die Lipide, liegen in der Literatur nicht vor. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass die zu dem Flüssigkonservierungsmedium chemisch supplementierten, endogen vorkommenden Fettsäuren metabolisch in die Lipide eingebaut werden. Die chemische Supplementierung mit der in porcinen *Spermatozoen* endogen nicht vorkommenden Eicosapentaensäure führte hingegen zu keiner metabolischen Aufnahme in die Lipide (4.3.3 - 4.3.6). Die Untersuchungen der Zytotoxizität von Octadecadiensäure unter einer Protein-vermittelten Verabreichung haben ergeben, dass bis zur Konzentration der Octadecadiensäure von 80 µM der Anteil der motilen *Spermatozoen* verglichen mit einer unbehandelten Kontrollprobe ansteigt. Der Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* blieb unter diesen Bedingungen hingegen konstant (4.3.1.4). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von (Hossain et al., 2007a; Hossain et al., 2007b) publiziert. Hierzu wurden Spermatozoenproben von zwei Individuen nach chemischer Supplementierung mit Fettsäuren bezüglich der Auswirkungen auf physiologische Parameter untersucht. Die vom Autor eingesetzten Fettsäurekonzentrationen konnten jedoch anhand der hier durchgeführten Experimente als zytotoxisch eingestuft werden (4.3.1). Somit ist der Vergleich mit den Literaturangaben auf Grund der eingesetzten Fettsäurekonzentration, den unterschiedlichen Flüssigkonservierungsbedingungen und der nur geringen Stichprobengröße nicht möglich.

#### **4.5.1 Festlegung der Stichprobengröße für Supplementierungsvarianten, Bestimmung der physiologischen Kriterien**

Die in der Fachliteratur *bis dato* beschriebenen Untersuchungen über die chemische Fettsäuresupplementierung von *Spermatozoen* wurden nur mit geringen Fallzahlen durchgeführt. Die statistischen Auswertungen haben unter diesen Bedingungen jedoch nur eine begrenzte Aussagekraft (Bower, 2003). Für die nachfolgenden Experimente wurden daher zuerst die Stichprobengröße und das zu verwendende statistische Testverfahren festgelegt. Bei der Auswertung werden jeweils verbundene Stichproben untersucht, wobei die Normalverteilung dieser experimentell erhaltenen Werte nicht angenommen wurde. Die Auswertung erfolgte somit anhand nicht-parametrischer Testverfahren für verbundene Stichproben. Um mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und einer Power von 0,75 einen Effekt nachzuweisen, bei dem in 90% der Fälle eine Zunahme (bzw. Abnahme) der experimentell ermittelten Werte zu beobachten ist, hat die Power-Analyse eine Stichprobengröße von mindestens 13 zu untersuchende Individuen (N=13) ergeben (Software: StudySize 2.0, CreoStat HB). Bei jeder Stichprobe wurden jeweils elf verschiedene physiologische Parameter untersucht. Diese sind die computergestützte Erfassung der Spermatozoengesamtmotilität und der progressiven Motilität (30 min / 300 min) nach 48 h und 168 h (3.5.3), der Vitalitätstest mittels durchflußzytometrischer Bestimmung nach Lebend / Tot-Färbung nach 72 h (3.5.2.1, 3.5.4) und die mikroskopische Untersuchung der Akrosomdefekte nach 24 h und nach 72 h (3.5.2.2). Bei der Untersuchung (mit N=13) porciner *Spermatozoen* auf die oben genannten elf physiologischen Parameter nach der Supplementierung mit jeweils einer von fünf unterschiedlichen Fettsäuren (6°C) und der zusätzlichen Analyse von zwei nicht supplementierten Kontrollproben (6°C und 17°C) müssen somit 1001 Datensätze erhoben werden. Bei so einer großen Anzahl von zu erhebenden Datensätzen kann ein Ausfall einzelner Proben nicht ausgeschlossen werden. Um die Mindestgröße der Stichprobe jedoch gewährleisten zu können, wurde die Anzahl der untersuchenden Individuen zur Absicherung auf 16 erhöht. Somit werden 1232 experimentelle Datensätze erhoben (Anhang 8.1.5).

#### 4.5.2 Verwendete statistische Testverfahren

Für die statistische Auswertung wurden insgesamt bis zu fünf Tests durchgeführt (Abb. 36). Im ersten Test wurden die unbehandelten Kontrollproben, die bei 6°C und bei 17°C flüssigkonserviert wurden, miteinander verglichen. Dieser Test dient zur Analyse, ob das Absinken der Temperatur bei der Flüssigkonservierung zu signifikanten Unterschieden in den untersuchten physiologischen Parametern führt (4.5.1). Test 2 und Test 3 dienten zur Überprüfung, ob die einzelnen Supplementierungsvarianten, die bei 6°C gelagert wurden, einen Einfluss auf den physiologischen Status ausüben, vergleichen mit den beiden unbehandelten Kontrollproben (Abb. 36, A).



**Abbildung 36: Übersicht der angewendeten statistischen Testverfahren**

Physiologische Auswirkungen der chemischen Supplementierung mit unterschiedlichen Fettsäuren auf porcine Spermatozoen.

**A.** Test 1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander; Test 2 und Test 3: jeweils paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben bei 17°C bzw. bei 6°C mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten;

**B.** Test 4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten (6°C) untereinander; Test 5: falls im vorangehenden Test 4 signifikante Unterschiede festgestellt wurden, erfolgte ein *a posteriori* Post-Hoc-Test (ungeplanter Test);

Test: 1, 2, 3 - Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Testverfahren (zweiseitig);

Test 4 Friedman-Test (zweiseitig);

Test 5: *a posteriori* Post-Hoc-Test (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, zweiseitig); Signifikanzen wurden mit der Bonferroni-Holm-Methode adjustiert.

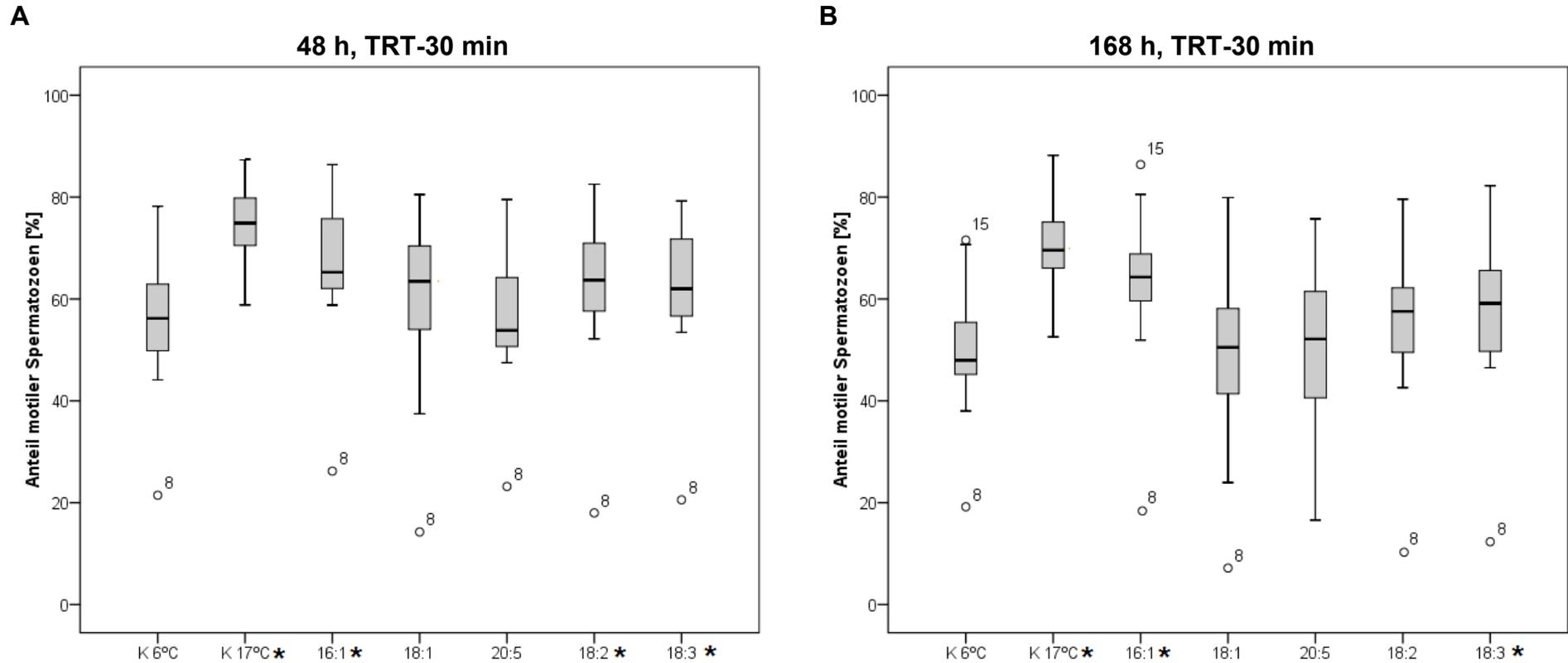
Test 1 bis Test 3 erfolgten mittels des zweiseitigen, nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Dieser diente zum Nachweis der Unterschiede zweier verbundener Stichproben. Als Nullhypothese wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem physiologischen Status nicht unterscheiden. Als Alternativhypothese wurde angenommen, dass die Proben physiologische Unterschiede aufweisen. Es wurde festgelegt, dass der Test nur dann signifikante Unterschiede liefert, wenn  $p \leq 0,05$  ist. Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert. Im Test 4 wurden die verbundenen Stichproben mittels zweiseitigem, nicht-parametrischen Friedman-Test überprüft. Im Gegensatz zum Wilcoxon-Vorzeichen-Test für verbundene Stichproben können mit diesem Test mehr als zwei Supplementierungsvarianten bezüglich der Unterschiede untersucht werden. Dieses Testverfahren diente allgemein zur Feststellung von Unterschieden innerhalb einer Gruppe (Abb. 36, B). Für den Friedman-Test wurde ebenfalls festgelegt, dass die Unterschiede zwischen den Supplementierungsvarianten nur dann signifikant sind, wenn  $p \leq 0,05$  ist. In diesem Fall wurden *a posteriori* die Post-Hoc-Tests mittels zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Testverfahren durchgeführt, wobei die Signifikanzen mit der Bonferroni-Holm-Methode adjustiert wurden. Post-Hoc-Tests können nur dann durchgeführt werden, wenn in dem vorangegangenen allgemeinen Test eine Signifikanz festgestellt wurde. Lag keine Signifikanz vor, so durften die Post-Hoc-Tests nicht interpretiert werden. Zur Absicherung der Analysen wurden nur die hochsignifikanten Unterschiede zwischen den Supplementierungsvarianten diskutiert. Die Ergebnisse von Test 1 bis Test 3 sind als Box-Plots dargestellt und auf die statistisch gesicherten Unterschiede wird im Text verwiesen. Die deskriptiven Statistiken sowie die ausführlichen Testergebnisse sind aus Gründen der Übersichtlichkeit dem Anhang 8.1.2 und 8.1.3 zu entnehmen.

Zusammenfassend wurden in diesem Teil der Arbeit die Stichprobengröße, die zu untersuchenden physiologischen Parameter sowie die Supplementierungsvarianten festgelegt. Desweiteren wurden die Hypothesen für die geplanten Tests formuliert und das Signifikanzniveau für alle verwendeten Testverfahren festgelegt. Im folgenden Kapitel werden die statistischen Auswertungen der untersuchten physiologischen Parameter dargestellt.

#### 4.5.3 Motilitätsanalyse flüssigkonservierter porciner *Spermatozoen* nach Fettsäuresupplementierung

Für die erfolgreiche Befruchtung der Eizelle müssen die *Spermatozoen* unter anderem über eine gute Motilität, eine funktionsfähige Plasmamembran, sowie ein intaktes Akrosom verfügen. Somit ist eine Aussage über den physiologischen Zustand der *Spermatozoen* nur dann möglich, wenn bei den *In-vitro*-Untersuchungen möglichst viele Faktoren berücksichtigt werden. Die Motilität der *Spermatozoen* stellt eine wesentliche Voraussetzung für die Befruchtung der Eizelle dar (Kapitel 1.2). Die Motilitätsanalyse erfolgte computerunterstützt mittels des Thermoresistenztests (TRT). Dieses Verfahren untersucht die Veränderungen der Motilität bei den flüssigkonservierten *Spermatozoen* nach Erhöhung der Lagerungstemperatur von 17°C bzw. 6°C auf die in dem weiblichen Genitaltrakt herrschenden 38°C. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min bzw. 300 min wurde die Motilität von 1.000 *Spermatozoen* computerunterstützt analysiert (3.5.3). Für die Motilitätsanalysen nach Supplementierung mit Fettsäuren wurden die porcinen *Spermatozoen* zuerst flüssigkonserviert (3.4), dann mit unterschiedlichen Fettsäuren supplementiert (3.10.1) und anschließend bei 6°C gelagert. Nach 48 h bzw. nach 168 h fand die Untersuchung mittels TRT statt. Die Gesamtmotilität und die progressive Motilität wurden jeweils nach einer Inkubation von 30 min (TRT-30) bzw. von 300 min (TRT-300) erfasst (3.5.3). Da nur geringfügige Unterschiede zwischen der Gesamtmotilität und progressiven Motilität festgestellt wurden (8.1.2, 8.1.3), wird in der folgenden Diskussion nur die Gesamtmotilität berücksichtigt. In der Abbildung 36 sind die Gesamtmotilitätswerte des TRT-30 nach 48 h bzw. nach 168 h Flüssigkonservierung dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im Folgenden nur die statistisch gesicherten Unterschiede erläutert. Ausführliche Testergebnisse sind im Anhang 8.1.2 (deskriptive Statistiken) und Anhang 8.1.3 (Testergebnisse) dargestellt.

In dem TRT-30 wurde gezeigt, dass 56% der *Spermatozoen* der unbehandelten Kontrollproben nach 48 h flüssigkonservierter Lagerung bei 6°C motil sind (Abb. 37). Bei 17°C sind nach 48 h hingegen 74% motil. Nach 168 h Lagerung sind 49% der bei 6°C und 71% der bei 17°C gelagerten *Spermatozoen* motil.



**Abbildung 37: Untersuchung der Gesamtmotilität porciner Spermatozoen mittels TRT-30**

Anteil gesamtmotiler porciner Spermatozoen in [%] nach **A.** 48 h Inkubation, 30 min bei 38°C; **B.** 168 h Inkubation, 30 min bei 38°C;

Inkubationsvarianten: K 6°C – unbehandelte Kontrollproben, Lagerung bei 6°C; K 17°C - unbehandelte Kontrollproben, Lagerung bei 17°C;

Fettsäuren: 16:1 – Hexadecensäure; 18:1 – Octadecensäure; 20:5 – Eicosapentaensäure; 18:2 – Octadecadiensäure; 18:3 – Octadecatriensäure;

Die Flüssigkonservierung wurde bei allen supplementierten Proben bei 6°C durchgeführt;

\* signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) bezogen auf die unbehandelten Kontrollproben (K 6°C); ° Ausreißer, die Beschriftung entspricht den Fallnummern;

Die Interpretation der Boxplot-Diagramme ist Anhang 8.1.4 zu entnehmen. Die Daten wurden mittels computerunterstützter Motilitätsanalyse (CASA) erhoben (3.5.3);  $n=1.000$  / Probe.

Somit ist bei beiden Untersuchungen eine Reduktion des Anteils der gesamtmotilen *Spermatozoen* durch die Niedrigtemperaturlagerung zu verzeichnen. Durch die statistischen Analysen der Datensätze des TRT-30 wurde gezeigt, dass die Reduktion der Gesamtmotilität bei 6°C verglichen mit 17°C in beiden Experimenten hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ) ist (8.1.2, 8.1.3). Die Lagerungstemperatur hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtmotilität porciner *Spermatozoen*. Dieser Temperatureinfluss wurde bereits in zahlreichen Experimenten beobachtet (Kumar et al., 2003; Medrano et al., 2009). In den folgenden Analysen werden die supplementierten Proben (6°C) mit den nicht behandelten Kontrollproben (6°C und 17°C) bezüglich ihrer Gesamtmotilität mittels TRT-30 nach 48 h und nach 168 h verglichen (Abb. 37). Nach 48 h Lagerung ist die Gesamtmotilität der mit 16:1, 18:2 und 18:3-Fettsäuren chemisch supplementierten Proben hoch signifikant erhöht ( $p \leq 0,001$ ). Der Anteil der gesamtmotilen *Spermatozoen* steigt für die Proben 16:1 von 55% auf 66% und für die Proben 18:2 sowie 18:3 von 55% auf 62% jeweils verglichen mit den Kontrollproben (6°C) an. Nach 168 h vergrößert sich der Anteil der gesamtmotilen *Spermatozoen* von 49% auf 62% für 16:1 ( $p \leq 0,001$ ) und von 49% auf 57% für die mit 18:3 ( $p \leq 0,008$ ) supplementierten Proben. Der Vergleich erfolgte jeweils mit den nicht supplementierten Kontrollproben (6°C). Alle Supplementierungsvarianten wiesen hoch signifikante ( $p \leq 0,001$ ) Unterschiede in der Gesamtmotilität sowohl nach 48 h als auch nach 168 h, jeweils verglichen mit den nicht behandelten Kontrollproben (17°C), auf. Somit wurde zum einem gezeigt, dass durch die Supplementierung mit Fettsäuren im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollproben eine Erhöhung der Gesamtmotilität zu verzeichnen war. Zum anderen wurde festgestellt, dass das Motilitätsniveau der gängigen Flüssigkonservierungsverfahren bei 17°C durch die Supplementierung und Lagerung bei 6°C nicht erreicht wurde.

In der graphischen Darstellung der experimentell ermittelten Datensätze sind in fast allen untersuchten Proben Ausreißer zu verzeichnen (Abb. 37). Es ist bekannt, dass Ausreißer unter anderem durch Fehler bei der Datenerhebung oder Dateneingabe entstehen könnten (Gather and Pawlitschko, 2006; Kuhnt and Pawlitschko, 2005). Dies kann dazu führen, dass dadurch die Ergebnisse der statistischen Untersuchungen verfälscht werden und somit die Interpretation der hinter dem Versuchsplan stehenden Hypothesen unmöglich wird. Da bei der

Gesamtmotilitätsanalyse bis zu 1.000 einzelnen *Spermatozoen* computerunterstützt mittels CASA detektiert und analysiert werden, konnten die oben genannten Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Die hier angewendeten graphischen Darstellungen als Boxplot-Diagramme geben Hinweise darüber, in welchem Bereich die Messwerte liegen und wie sie sich über diesen Bereich verteilen. Ausreißer sind per Definition solche Werte, die das 1. und 3. Quartil (Box) um mehr als das 1,5-fache des Interquartilbereichs über- bzw. unterschreiten (Chambers et al., 1983; Gather and Pawlitschko, 2006; Hoaglin et al., 1983; Kuhnt and Pawlitschko, 2005). Die Größe der Box (Interquartilbereich) wird durch die Streuung und Verteilung der Messwerte definiert. Der Faktor 1,5 zur Definition der Ausreißer ist nicht allgemein gültig und basiert auf den zugrunde liegenden Messwerten und ist ebenfalls von der Streuung der Messwerte abhängig (Details siehe Anhang 8.1.4). Daher wird in den nachfolgenden Auswertungen nur auf die auffälligen, sich in allen Untersuchungen wiederholenden Ausreißer eingegangen. Die Beschriftung entspricht der jeweiligen Datensatznummer und ermöglicht somit eine eindeutige Zuordnung zum jeweils untersuchten Individuum. Bei den hier durchgeführten *In-vitro*-Untersuchungen wurden die Spermatozoenproben von Individuum 8 und Individuum 15 als auffällig klassifiziert.

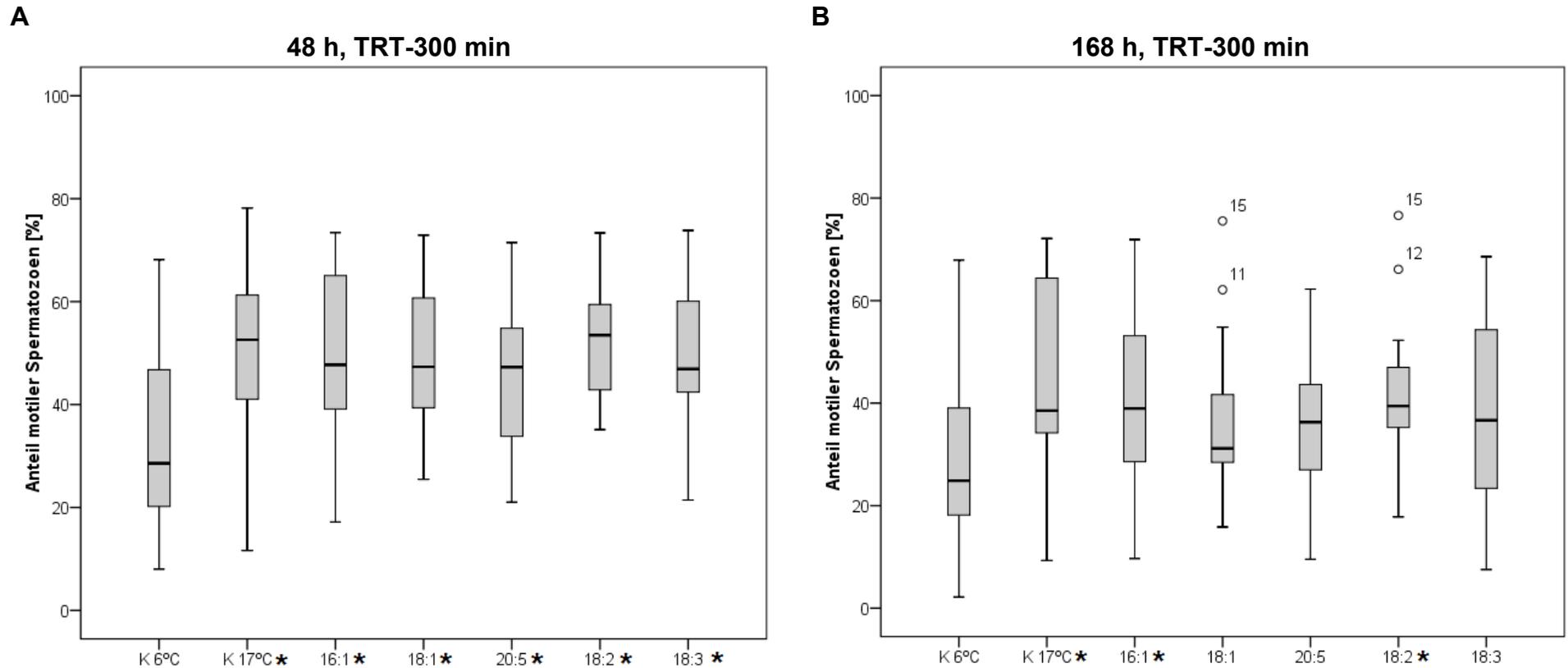
Bei Individuum 8 sind in allen untersuchten Proben, die bei 6°C flüssigkonserviert wurden, deutlich geringere Anteile von gesamtmotilen *Spermatozoen* zu verzeichnen (Abb. 37). Die chemische Supplementierung mit den hier verwendeten Fettsäuren führte bei den *Spermatozoen* von diesem Individuum zu keiner Erhöhung der Gesamtmotilität. In beiden Kontrollproben, die bei 17°C gelagert wurden, wiesen diese *Spermatozoen* jedoch keine Auffälligkeiten bezüglich der Gesamtmotilität auf. Dies deutet darauf hin, dass sie besonders sensibel auf einer Lagerung bei 6°C reagieren. In der Fachliteratur wurde bereits beschrieben, dass die porcinen *Spermatozoen*, verglichen mit andern Tierarten sowie humanen *Spermatozoen*, kältesensibler reagieren (Medeiros et al., 2002; Medrano et al., 2009; Waterhouse et al., 2006; Watson and Plummer, 1985). Bei einzelnen Individuen bzw. Ejakulaten wurde bereits eine deutlich erhöhte Kältesensibilität beschrieben (Medrano et al., 2009). Die genauen Ursachen hierfür sind jedoch unbekannt. Bei Individuum 15 war sowohl in den Kontrollproben (6°C) als auch bei den mit 16:1-Fettsäure

supplementierten Proben nach 168 h eine geringfügig erhöhte Motilität zu verzeichnen.

In dem anschließenden Experiment wurden die gesamtmotilen *Spermatozoen* nach einer 300 minütigen Erhöhung der Lagerungstemperatur von 17°C bzw. 6°C, auf die in dem weiblichen Genitaltrakt herrschenden 38°C, computerunterstützt erfasst. In der Abbildung 38 sind die Gesamtmotilitätswerte des TRT-300 nach 48 h bzw. nach 168 h Flüssigkonservierung dargestellt.

Anhand des TRT-300 sind 33% der *Spermatozoen* der unbehandelten Kontrollproben nach 48 h flüssigkonservierter Lagerung bei 6°C motil (Abb. 38). Bei 17°C sind nach 48 h hingegen 50% motil. Nach 168 h Lagerung sind 31% der bei 6°C und 45% der bei 17°C gelagerten *Spermatozoen* motil. Somit ist auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen, wie bereits bei TRT-30 gezeigt wurde, eine Verringerung des Anteils der gesamtmotilen *Spermatozoen* durch die Niedrigtemperaturlagerung zu verzeichnen. Die statistischen Analysen haben gezeigt, dass die Reduktion der Gesamtmotilität bei 6°C verglichen mit 17°C in beiden Experimenten signifikant ( $p \leq 0,05$ ) ist (Anhang 8.1.2, 8.1.3). Somit wurde auch nach 300-minütiger Inkubation bei 38°C ein Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Gesamtmotilität porciner *Spermatozoen* nachgewiesen.

In den folgenden Analysen werden, wie bereits bei TRT-30 beschrieben, die supplementierten Proben (6°C) mit den nicht behandelten Kontrollproben (6°C und 17°C) bezüglich ihrer Gesamtmotilität nun mittels TRT-300 verglichen (Abb. 38). Nach 48 h Lagerung ist die Gesamtmotilität von allen chemisch supplementierten Proben hoch signifikant erhöht ( $p \leq 0,001$ ). Der Anteil der gesamtmotilen *Spermatozoen* steigt verglichen mit den Kontrollproben (6°C) beispielsweise für die mit 16:1 supplementierten Proben von 33% auf 50% und für die mit 18:2 supplementierten Proben von 33% auf 53% an.



**Abbildung 38: Untersuchung der Gesamtmotilität porciner Spermatozoen mittels TRT-300**

Anteil gesamtmotiler, porciner Spermatozoen in [%] nach **A**. 48 h Inkubation, 300 min bei 38°C; **B**. 168 h Inkubation, 300 min bei 38°C; Inkubationsvarianten: K 6°C – unbehandelte Kontrollproben, Lagerung bei 6°C; K 17°C - unbehandelte Kontrollproben, Lagerung bei 17°C; Fettsäuren: 16:1 – Hexadecensäure; 18:1 – Octadecensäure; 20:5 – Eicosapentaensäure; 18:2 – Octadecadiensäure; 18:3 – Octadecatriensäure; Die Flüssigkonservierung wurde bei allen supplementierten Proben bei 6°C durchgeführt;

\* signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) bezogen auf die unbehandelten Kontrollproben (K 6°C); ° Ausreißer, die Beschriftung entspricht den Fallnummern; Die Interpretation der Boxplot-Diagramme ist Anhang 8.1.4 zu entnehmen. Die Daten wurden mittels computerunterstützter Motilitätsanalyse (CASA) erhoben (3.5.3);  $n=1.000$  / Probe.

Nach 168 h ist jedoch nur bei diesen beiden Proben ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) in der Gesamtmotilität zu verzeichnen. Der Anteil der gesamtmotilen *Spermatozoen* steigt in TRT-300 nach 168 h von 31% auf 42% für die 16:1- und für die 18:2-Supplementierungsvariante ( $p \leq 0,05$ ), ebenfalls bezogen auf die nicht supplementierten Kontrollproben (6°C) an. Der Vergleich aller supplementierten Varianten mit den nicht behandelten Kontrollproben (17°C) wies nach 48 h-Lagerung keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtmotilität auf. Nach 168 h Lagerung wurden nur für die mit 20:5 supplementierten Proben signifikante ( $p=0,008$ ) Unterschiede festgestellt. Somit wurde zum einem gezeigt, dass durch die Supplementierung mit Fettsäuren eine Erhöhung der Gesamtmotilität verglichen mit den unbehandelten Kontrollproben erreicht wurde. Zum anderen wurde festgestellt, dass nach 168 h das Motilitätsniveau der gängigen Flüssigkonservierungsverfahren bei 17°C durch die Supplementierung und Lagerung bei 6°C mit Ausnahme der mit 20:5 supplementierten Proben erreicht wurde. Nach 168 h in TRT-300 wurden wie im vorangegangenen TRT-30 die Proben von Individuum 15 als Ausreißer klassifiziert. Diese Proben wiesen nach der Supplementierung mit 18:1 oder mit 18:2-Fettsäure eine deutlich erhöhte Gesamtmotilität auf.

Zusammenfassend wurde in diesen Experimenten gezeigt, dass die Lagerungstemperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtmotilität porciner *Spermatozoen* hat. Die bei 6°C flüssigkonservierten Proben wiesen eine deutlich geringere Gesamtmotilität verglichen mit den bei 17°C gelagerten Proben auf. Im TRT-30 wurde zu beiden Untersuchungszeitpunkten (48 h und 168 h) für alle chemisch supplementierten Proben (6°C), mit Ausnahme von 20:5, ein signifikant erhöhter Anteil von gesamtmotilen *Spermatozoen*, verglichen mit den unbehandelten Kontrollproben (6°C), beobachtet. Die Zunahme der Gesamtmotilität war für die mit 16:1-Fettsäure supplementierten Proben am deutlichsten. Das Motilitätsniveau der gängigen Flüssigkonservierungsverfahren bei 17°C konnte jedoch in TRT-300 durch keine der hier untersuchten Supplementierungsvarianten bei 6°C erreicht werden. Beim Vergleich zwischen TRT-30 und TRT-300 wurde festgestellt, dass das Motilitätsniveau aller untersuchten Proben (6°C und 17°C) im TRT-300 geringer war. Bei allen Supplementierungsvarianten (6°C), mit Ausnahme der mit 20:5 supplementierten Proben, wurde im TRT-300 ein annähernd gleicher Anteil von gesamtmotilen *Spermatozoen* wie in den unbehandelten Kontrollproben (17°C)

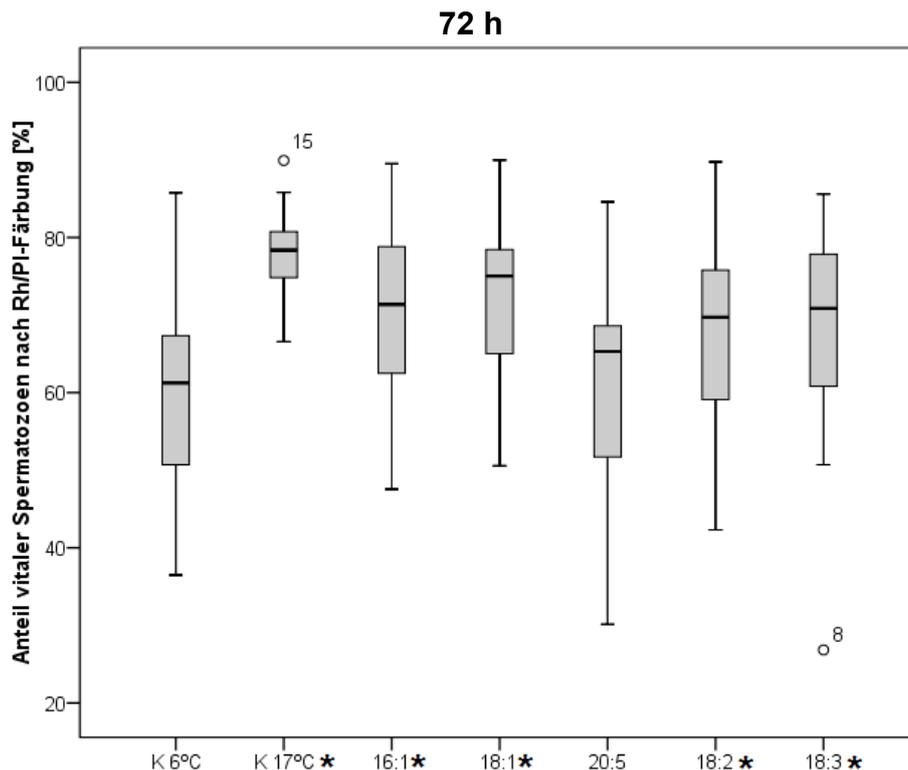
nachgewiesen. Desweiteren wurden kältesensible Proben im TRT-30 beobachtet und diese konnten einem bestimmten Individuum zugeordnet werden. Im TRT-300 zeigte dieses Individuum jedoch keine signifikante Abnahme der Gesamtmotilität in allen bei 6°C flüssigkonservierten Proben. Somit kann davon ausgegangen werden, dass nach 300-minütiger Inkubation bei 38°C eine Regeneration des physiologischen Zustandes der *Spermatozoen*, die zuvor bei 6°C gelagert wurden, stattfand. Keine der verwendeten Supplementierungsvarianten übte einen Einfluss auf die Regeneration der kältesensiblen *Spermatozoen* aus. Desweiteren wurde bei den *Spermatozoen* eines anderen Individuums eine ausgeprägte Erhöhung der Gesamtmotilität nach der Supplementierung mit 16:1, 18:1 und 18:2 beobachtet. Der metabolische Einbau dieser Fettsäuren wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen für porcine *Spermatozoen* nachgewiesen (4.3.5). Ob diese individuumsspezifische Erhöhung der Gesamtmotilität supplementierungsbedingt oder ejakulatspezifisch ist, sollte in einem separaten Projekt anhand der hier etablierten Methoden näher untersucht werden.

#### **4.5.4 Vitalitätsanalyse flüssigkonservierter, porciner *Spermatozoen* nach Fettsäuresupplementierung**

Ein weiterer Parameter für die Beurteilung des physiologischen Zustands der porcinen *Spermatozoen* ist die Beurteilung ihre Vitalität. Diese lässt sich zum einen durch die Integrität der Plasmamembran und zum anderen durch die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien erfassen. Die Bestimmung der Spermatozoenvitalität erfolgte durch Vitalfärbung mittels der Farbstoffe Propidiumjodid (PI) und Rhodamin123 (Rh123). PI wirkt als Nukleinsäureinterkalator und kann die perforierte Zellmembran von toten Zellen, aber in der Regel nicht die intakte Membran von lebenden Zellen, durchdringen. Daher ist es durch die Markierung mit PI möglich, zwischen lebenden und toten *Spermatozoen* zu differenzieren. Die Markierung funktionsfähiger Mitochondrien erfolgte durch Rh123. Zur Untersuchung der Vitalität nach der Supplementierung mit Fettsäuren wurden die porcinen *Spermatozoen* flüssigkonserviert (3.4) und mit unterschiedlichen Fettsäuren supplementiert (3.10.1). Nach 72 h Inkubation bei 6°C fand anschließend die Vitalitätsanalyse mittels Rh123 / PI-Markierung statt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Proben (6°C und 17°C). Die Auswertung der so lebend-tot markierten

*Spermatozoen* wurde mittels durchflußzytometrischer Techniken durchgeführt (3.5.2.1, 3.5.4).

In dem Vitalitätstest mittels Rh123 / PI-Markierung wurde gezeigt, dass in den unbehandelten Kontrollproben 60% der *Spermatozoen* nach 72 h flüssigkonservierter Lagerung bei 6°C vital sind (Abb. 39).



**Abbildung 39: Untersuchung der Vitalität porciner Spermatozoen mittels Rh123/PI-Markierung**

Anteil vitaler *Spermatozoen* in [%] nach 72 h Inkubation; Inkubationsvarianten: K 6°C – unbehandelte Kontrollproben, Lagerung bei 6°C; K 17°C - unbehandelte Kontrollproben, Lagerung bei 17°C; Fettsäuren: 16:1 – Hexadecensäure; 18:1 – Octadecensäure; 20:5 – Eicosapentaensäure; 18:2 – Octadecadiensäure; 18:3 – Octadecatriensäure; Die Flüssigkonservierung wurde bei allen supplementierten Proben bei 6°C durchgeführt;  $n=15.000$  / Probe;

\* signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) bezogen auf die unbehandelten Kontrollproben (K 6°C);

° Ausreißer, die Beschriftung entspricht den Fallnummern; Die Interpretation der Boxplot-Diagramme sind 8.1.4 zu entnehmen. Die Daten wurden mittels Rh123 / PI-Markierung und anschließender durchflußzytometrischer Messung erhoben (3.5.2.1, 3.5.4).

Bei 17°C sind zu diesem Zeitpunkt hingegen 78% vital. Somit ist eine Reduktion des Anteils der vitalen *Spermatozoen* durch die Niedrigtemperaturlagerung zu verzeichnen. Aus den statistischen Analysen der Datensätze geht hervor, dass die Reduktion des Anteils vitaler *Spermatozoen* bei 6°C verglichen mit 17°C hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ) ist (Anhang 8.1.2-8.1.3). Die Lagerungstemperatur hat somit auch einen entscheidenden Einfluss auf die Vitalität porciner *Spermatozoen*. Nach

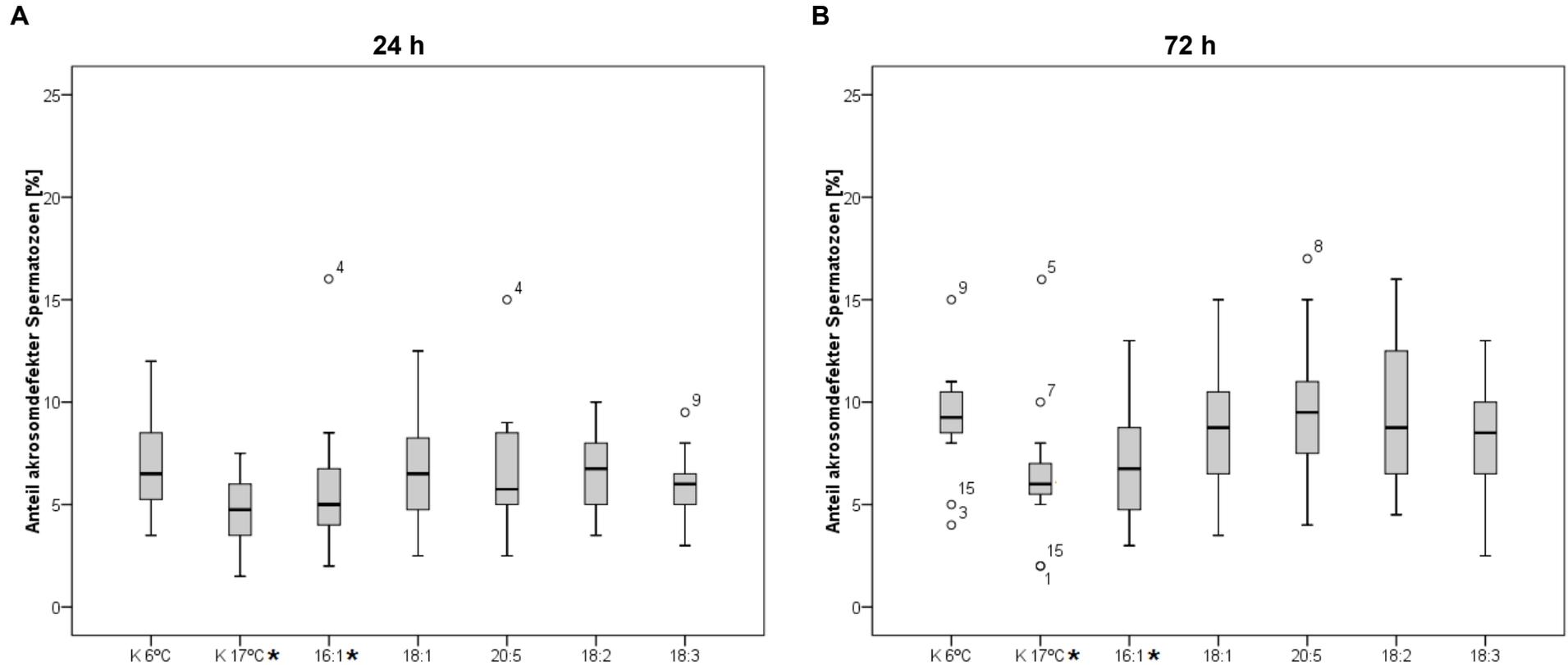
72 h Lagerung bei 6°C ist die Vitalität von allen chemisch supplementierten Proben, mit Ausnahme von 20:5, verglichen mit den unbehandelten Kontrollproben (6°C) hoch signifikant erhöht ( $p \leq 0,001$ ). Ein deutlich erhöhter Anteil vitaler *Spermatozoen* wurde in den mit 16:1 und mit 18:1 supplementierten Proben nachgewiesen. Dieser Anteil stieg beispielsweise für die mit 16:1 supplementierten Proben von 60% auf 71% und für die mit 18:1 supplementierten Proben von 60% auf 72%, jeweils verglichen mit den Kontrollproben (6°C), an. Aus den statistischen Analysen der Datensätze geht hervor, dass die Reduktion des Anteils von vitalen *Spermatozoen* bei allen supplementierten Varianten (6°C), verglichen mit den unbehandelten Kontrollproben (17°C), signifikant ( $p \leq 0,05$ ) ist. Die bei den vorangegangenen Motilitätsstudien auffälligen Individuen wurden auch in diesem Vitalitätstest als Ausreißer klassifiziert. Die kältesensiblen *Spermatozoen* von Individuum 8 wiesen nach der Supplementierung mit 18:3-Fettsäure einen deutlich geringeren Anteil von vitalen *Spermatozoen* auf. Die in den vorangegangenen Motilitätsuntersuchungen ebenfalls auffälligen *Spermatozoen* von Individuum 15 wiesen in allen untersuchten Proben den höchsten Anteil vitaler *Spermatozoen* auf. Nur in den unbehandelten Kontrollproben (17°C) wird auf Grund der geringeren Streuung aller Datensätze dieses Individuum als Ausreißer eingestuft. Die beiden in ihrer Vitalität auffälligen Proben von Individuum 8 und Individuum 15 stützen somit die Ergebnisse der vorangegangenen Motilitätsanalysen (4.5.3).

Zusammenfassend wurde in diesem Experiment gezeigt, dass alle verwendeten Supplementierungsvarianten, mit Ausnahme von 20:5-Fettsäure, zu einer signifikanten Erhöhung der Spermatozoenvitalität führten. Das Vitalitätsniveau der gängigen Flüssigkonservierungsverfahren (17°C) wurde jedoch bei keiner der untersuchten Supplementierungsvarianten (6°C) erreicht.

#### **4.5.5 Untersuchung des akrosomalen Status flüssigkonservierter porciner *Spermatozoen* nach Fettsäuresupplementierung**

Die Befruchtungskompetenz der *Spermatozoen* ist zum einem durch ihre Motilität, Plasmamembranintegrität sowie ihre Vitalität gekennzeichnet (1.2, 1.3). Ein weiterer wichtiger Parameter zur Gesamtbeurteilung des physiologischen Zustandes ist der akrosomale Status der *Spermatozoen* (Curry and Watson, 1995). Porcine

*Spermatozoen* reagieren im Vergleich zu anderen Tierarten sowie zu humanen *Spermatozoen* sehr empfindlich auf eine Niedrigtemperaturlagerung (Rusu *et al.*, 2011). Im folgenden Experiment wurden die Auswirkungen der Niedrigtemperaturlagerung sowie der Fettsäuresupplementierung auf den akrosomalen Status porciner *Spermatozoen* untersucht. Hierfür wurden die *Spermatozoen* zuerst flüssigkonserviert (3.4), dann mit unterschiedlichen Fettsäuren supplementiert (3.10.1) und nach einer Inkubation von 24 h bzw. 72 h fixiert (3.5.2.2). Anschließend erfolgte die mikroskopische Untersuchung des akrosomalen Status. Die Auswertung hat ergeben, dass 7% der *Spermatozoen* in den unbehandelten Kontrollproben (6°C) nach 24 h flüssigkonservierter Lagerung Akrosomdefekte aufweisen (Abb. 40). Bei den unbehandelten Kontrollproben (17°C) sind zu diesem Zeitpunkt hingegen 5% akrosomdefekt. Aus den statistischen Analysen der Datensätze geht hervor, dass die Zunahme des Anteils akrosomdefekter *Spermatozoen* bei 6°C verglichen mit 17°C sowohl nach 24 h als auch nach 72 h Flüssigkonservierung signifikant ( $p \leq 0,05$ ) ist (Anhang 8.1.2-8.1.3). Die Lagerungstemperatur hat somit auch einen entscheidenden Einfluss auf den akrosomalen Status porciner *Spermatozoen*.



**Abbildung 40: Mikroskopische Untersuchung akrosomdefekter porciner Spermatozoen**

Untersuchung akrosomdefekter *Spermatozoen* nach **A.** 24 h Lagerung; **B.** nach einer 72 h Lagerung;

Inkubationsvarianten: K 6°C – unbehandelte Kontrollproben, Lagerung bei 6°C; K 17°C - unbehandelte Kontrollproben, Lagerung bei 17°C;

Fettsäuren: 16:1 – Hexadecensäure; 18:1 – Octadecensäure; 20:5 – Eicosapentaensäure; 18:2 – Octadecadiensäure; 18:3 – Octadecatriensäure;

Die Flüssigkonservierung wurde bei allen supplementierten Proben bei 6°C durchgeführt;  $n=200$  / Probe;

\* signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) bezogen auf die unbehandelten Kontrollproben (K 6°C);

° Ausreißer, die Beschriftung entspricht den Fallnummern; Die Interpretation der Boxplot-Diagramme ist 8.1.4 zu entnehmen. Die Angaben zur Fixierung der *Spermatozoen* und die Bedingungen der mikroskopischen Untersuchungen siehe 3.5.2.2.

In den folgenden Analysen werden die supplementierten Proben (6°C) mit den nicht behandelten Kontrollproben (6°C und 17°C) bezüglich ihres akrosomalen Status nach 24 h und nach 72 h verglichen. Zu beiden Zeitpunkten ist nur bei den mit 16:1 chemisch supplementierten Proben der Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* signifikant niedriger ( $p \leq 0,05$ ) verglichen mit den unbehandelten Kontrollproben (6°C). Bei dem Vergleich der supplementierten Proben (6°C) mit den unbehandelten Kontrollproben (17°C) wurde für alle Supplementierungsvarianten, mit Ausnahme von 16:1, eine signifikante Zunahme des Anteils akrosomdefekter *Spermatozoen* nachgewiesen. Somit wurde festgestellt, dass durch die Supplementierung mit 16:1 bei Niedrigtemperaturlagerung weniger akrosomdefekte *Spermatozoen*, verglichen mit den unbehandelten Kontrollproben (6°C), vorhanden sind. Diese Supplementierungsvariante (6°C) führt zu einem vergleichbar geringen Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* wie die gängigen Flüssigkonservierungsverfahren bei 17°C.

Bei der Auswertung der Datensätze wurden im Vergleich mit den vorangegangenen Untersuchungen deutlich mehr Ausreißer klassifiziert. Eine mögliche Ursache hierfür kann die geringe Anzahl ( $n=2 \times 10^2$ ) der einzeln untersuchten *Spermatozoen* aus einer Gesamtprobe ( $n=2 \times 10^9$ ) sein. Auch die Subjektivität bei der Einstufung des akrosomalen Status kann dafür verantwortlich sein (Gadea, 2005). Durch die Anwendung des für Ausreißer unempfindlichen nicht-parametrischen Vorrang-Test-Verfahrens können die oben genannten möglichen Fehlerquellen minimiert werden.

Zusammenfassend wurde in diesen Experimenten gezeigt, dass bei der Niedrigtemperaturlagerung (6°C) ein häufigeres Auftreten von akrosomalen Schäden bei den porcinen *Spermatozoen* beobachtet wurde. Die Supplementierung bei 6°C mit 16:1 führte zu einer signifikanten Verringerung des Anteils akrosomdefekter *Spermatozoen*. Der Anteil akrosomdefekter *Spermatozoen* entsprach nur bei dieser 16:1-Supplementierungsvariante dem Niveau der unbehandelten Kontrollproben, die bei 17°C gelagert wurden.

#### **4.5.6 Vergleich der Supplementierungsvarianten untereinander bezüglich ihrer physiologischen Auswirkungen**

In den vorangegangenen Untersuchungen wurden zuerst der physiologische Zustand von flüssigkonservierten *Spermatozoen* bei unbehandelten Kontrollproben (6°C und 17°C) zueinander verglichen (Test 1). Dann erfolgte ein paarweiser Vergleich der unterschiedlich supplementierten Proben mit den beiden Kontrollproben (Test 2 und Test 3). Die paarweise angewendeten statistischen Analysen ermöglichen keine Vergleiche der Supplementierungsvarianten untereinander bezüglich ihrer physiologischen Auswirkungen. Daher wurden die verwendeten Supplementierungsvarianten zuerst miteinander in einem globalen Test verglichen (Test 4). Falls in diesem Test signifikante Unterschiede für die untersuchten physiologischen Parameter festgestellt wurden, erfolgte dann ein ungeplanter Post-Hoc-Test (Test 5). Für die Bewertung des physiologischen Zustandes der porcinen *Spermatozoen* wurden elf verschiedene Untersuchungen je Supplementierungsvariante durchgeführt (8.1.5). Beim Vergleich dieser Varianten untereinander wurden mittels des globalen Tests bei zwei Untersuchungen (Erfassung der Gesamtmotilität in TRT-300 nach 48 h; akrosomaler Status nach 72 h) signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Unterschiede nachgewiesen. Bei fünf Untersuchungen (je Erfassung der Gesamt- und progressiven Motilität in TRT-30 nach 48 h und nach 168 h; Vitalitätstest Rh123/PI nach 72 h) waren die Unterschiede hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ). Daher wurde für diese sieben Untersuchungen im Anschluss jeweils ein Post-Hoc-Test durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Tests dürfen nur dann interpretiert werden, wenn der vorangegangene Friedmann-Test signifikant ( $p \leq 0,05$ ) war. Um die Aussagekraft der statistischen Analysen jedoch zu erhöhen, wird in der folgenden Diskussion nur auf die hochsignifikanten Unterschiede zwischen den Supplementierungsvarianten eingegangen ( $p \leq 0,001$ ). Die Ergebnisse des Post-Hoc-Tests sind in Tabelle 11 dargestellt. Die statistische Analyse hat ergeben, dass hochsignifikante Unterschiede nur beim jeweiligen Vergleich entweder mit 20:5 oder 16:1 vorhanden sind. Dies weist nur darauf hin, dass die Supplementierung mit einer von diesen beiden Fettsäuren im Vergleich mit den anderen getesteten Supplementierungsvarianten sich deutlich unterscheidet.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tabelle 11: Ergebnisse des Post-Hoc-Tests. Vergleich der Supplementierungsvarianten untereinander bezüglich ihrer physiologischen Auswirkungen.**

Vergleich		Beurteilung des physiologischen Zustandes				
		A1	A2	A5	A6	A9
16:1	18:1	0,012	0,023	0,005	0,005	0,697
	20:5	0,000	0,000	0,022	0,037	0,001
	18:2	0,021	0,150	0,022	0,037	0,140
	18:3	0,012	0,148	0,024	0,160	0,526
18:1	16:1	0,012	0,023	0,005	0,005	0,697
	20:5	0,262	0,578	0,751	0,542	0,001
	18:2	0,807	0,578	0,199	0,199	0,025
	18:3	0,823	0,701	0,028	0,031	0,333
18:2	16:1	0,021	0,150	0,022	0,037	0,140
	18:1	0,807	0,578	0,199	0,199	0,025
	20:5	0,006	0,013	0,649	0,751	0,000
	18:3	0,929	0,860	0,424	1,000	0,782
18:3	16:1	0,012	0,148	0,024	0,160	0,526
	18:1	0,823	0,701	0,028	0,031	0,333
	20:5	0,003	0,012	0,377	0,272	0,004
	18:2	0,929	0,860	0,424	1,000	0,782
20:5	16:1	0,000	0,000	0,022	0,037	0,001
	18:1	0,262	0,578	0,751	0,542	0,001
	18:2	0,006	0,013	0,649	0,751	0,000
	18:3	0,003	0,012	0,377	0,272	0,004

**A1:** TRT-30min nach 48 h (Gesamtmotilität); **A2:** TRT-30min nach 48 h (progressive Motilität);  
**A5:** TRT-30min nach 168 h (Gesamtmotilität); **A6:** TRT-30min nach 168 h (progressive Motilität);  
**A9:** Vitalitätstest Rh123 / PI nach 72 h.

Hochsignifikante ( $p \leq 0,001$ ) Ergebnisse sind grau unterlegt. Die Beschriftung der durchgeführten Untersuchungen der physiologischen Parameter entspricht der Darstellung im Anhang 8.1.3.

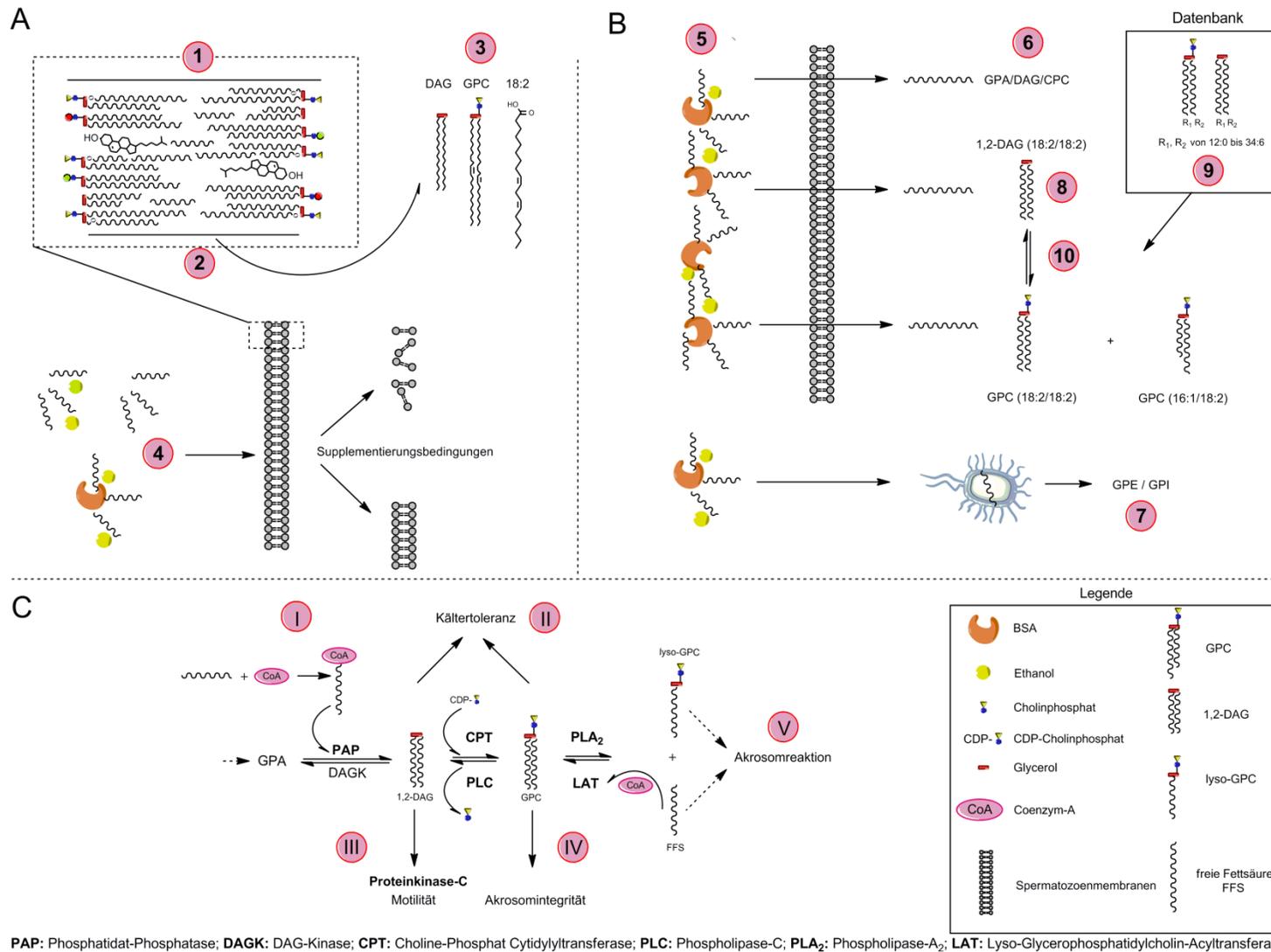
Ob der Effekt bei dem jeweils angewendeten Versuch eine positive oder eine negative Auswirkung auf den physiologischen Zustand der *Spermatozoen* ausübt, kann anhand vorliegender Signifikanz nicht beurteilt werden. Für diese Bewertung ist die Betrachtung der positiven und negativen Ränge des Post-Hoc-Tests notwendig (8.1.3). Dies hat ergeben, dass die Supplementierung mit 16:1 verglichen mit der 20:5-Supplementierungsvariante in TRT-30 nach 48 h zu einer Erhöhung des Anteils von gesamt- und progressiven motilen *Spermatozoen* und auch zu einer Erhöhung des Anteils vitaler *Spermatozoen* führt. Die Supplementierung mit 20:5 führte jeweils verglichen mit den 16:1-, 18:1- und 18:2-Supplementierungsvarianten zu einer Reduktion des Anteils von vitalen *Spermatozoen*. Bei der Untersuchung der Gesamt- und Progressivmotilität TRT-30 nach 168 h unterschieden sich die verwendeten Supplementierungsvarianten nicht hochsignifikant. Für die 18:3-Supplementierungsvariante wurde ebenfalls in keiner der durchgeführten Untersuchungen hochsignifikante Unterschiede festgestellt.

#### 4.6 *Abschließender Überblick*

Im Folgenden wird eine kritische Zusammenfassung der Ergebnis- und Diskussionkapitel des ersten Teils der Arbeit dargestellt, die sich mit dem Einbau von Fettsäuren in porcine Spermatozoenlipide befasst. Danach werden die physiologischen Auswirkungen auf Parameter während der Flüssigkonservierung bei niedrigen Temperaturen dargestellt und auf möglichen Ursachen dafür anhand des Vergleichs mit den Angaben in der Fachliteratur kurz eingegangen. Abschließend erfolgt eine allgemeine Zusammenfassung mit Ausblick.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit den physiologischen Veränderungen porciner *Spermatozoen*, die durch einen metabolischen Einbau von Fettsäuren (Hexadecensäure, Octadecensäure, Octadecadiensäure, Octadecatriensäure, Eicosapentaensäure) in ihre Lipide hervorgerufen werden (Abb. 41). Dazu wurde zunächst ① die Lipidzusammensetzung porciner *Spermatozoen* untersucht, ② gefolgt von Fettsäureanalysen einzelner Lipidklassen. Es wurden polare und neutrale Lipide detailliert untersucht. Hauptvertreter der polaren Lipidklassen sind Glycerophospholipide (GPC, GPE) und diese sind sowohl durch das Vorkommen von *diacyl-* als auch durch Ether-Lipidspezies gekennzeichnet. Die Fettsäuren und Fetaldehyde dieser Spezies sind mittel- und langkettig und vor allem hochgradig ungesättigt. Der Hauptvertreter der neutralen Lipidklassen ist Diacylglycerol (1,2-DAG) mit mittlerer Kettenlänge und hauptsächlich gesättigten Resten. 1,2-DAG ist die Vorstufe bei der Biosynthese von Glycerophospholipiden (GPL). Da Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung bei DAG und GPL festgestellt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass keine aktive Biosynthese von GPL mit ungesättigten Acyl-Resten in flüssigkonservierten porcinen *Spermatozoen* stattfindet. Die Untersuchungen der metabolischen Aufnahme von Fettsäuren in Spermatozoenlipide wurden mittels chemischer Supplementierung durchgeführt. Als Substrat wurde die ungesättigte mittelkettige Octadecadiensäure ③, die in GPC aber nicht in 1,2-DAG vorkommt, ausgewählt; ④ die Supplementierungsbedingungen wurden analysiert und ⑤ anschließend wurden die einzusetzenden Konzentrationen festgelegt.

# ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abbildung 41: Aufnahme von Fettsäuren in die Lipide porciner Spermatozoen und physiologische Auswirkungen.**

**A. Lipid und Fettsäurezusammensetzung:**

- ① Analyse der Lipidzusammensetzung.
- ② Untersuchung der Fettsäure- und Fetaldehydzusammensetzung einzelner Lipidklassen porciner Spermatozoen (Kapitel:4.1, 4.2).
- ③ Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung zwischen DAG und GPL. Octadecadiensäure (18:2) ist das Substrat für die Untersuchungen der metabolischen Aufnahme von Fettsäuren (Kapitel:4.3).
- ④ Analyse der Supplementierungsbedingungen in Zytotoxizitätsassays (Kapitel: 4.3.1.1-4.3.1.3).

**B. Untersuchung des metabolischen Einbaus:**

- ⑤ Bestimmung der einzusetzenden Konzentrationen einzelner Komponenten des Supplementierungsmediums (Kapitel:4.3.1.4).
- ⑥ Radiochemische Untersuchungen des metabolischen Einbaus von 18:2 in GPA, 1,2-DAG und GPC (Kapitel: 4.3.3-4.3.5).
- ⑦ Bakterielle Metabolisierung, Analyse des metabolischen Einbaus von 18:2 in die bakteriellen GPE / GPI (Kapitel: 4.3.2).
- ⑧ Nachweis der *de-novo* Entstehung des ungesättigten DAG (18:2 / 18:2) (Kapitel: 4.3.4, 4.3.5.2). Die endogen in porcinen Spermatozoen vorkommenden 16:1, 18:1, 18:2, 18:3 werden als Substrat für die Lipidbiosynthese akzeptiert. 20:5 kommt in den Lipiden nicht vor und wird nicht als Substrat akzeptiert (Kapitel:4.3.6)
- ⑨ Erstellung einer Datenbank für alle möglicherweise in porcinen Spermatozoen vorkommenden DAG und GPC (Kapitel: 4.3.5, 8.1.1).

⑩ Nachweis von DAG(18:2/18:2), GPC (16:1/18:2) und GPC (18:2/18:2) mittels hochauflösender Massenspektrometrie (Kapitel: 4.3.5.1). Ein bevorzugter metabolischer Einbau entweder in 1,2-DAG oder GPC ist von der Menge des Substrates, Dauer der Supplementierung sowie der Inkubationstemperatur abhängig. Das Seminalplasma kann die metabolische Aufnahme zusätzlich beeinflussen (Kapitel:4.4.1-4.4.4). Niedrigtemperaturlagerung führt zur Reduktion der bakteriellen Kontamination (Kapitel: 4.4.3).

**C. Metabolische Aufnahme von freien Fettsäuren in die Spermatozoenlipide und mögliche Mechanismen der physiologischen Auswirkungen:** siehe Kapitel: 4.4.3-4.5.

Die metabolische Aufnahme der Octadecadiensäure erfolgte entweder in die Lipide porciner *Spermatozoen* (⑥: GPA, 1,2-DAG, GPC) oder in die bakteriellen Lipide (⑦: GPI, GPE). Nach der chemischen Supplementierung mit Octadecadiensäure wurde eine *de-novo* Entstehung von ungesättigtem mittelkettigem 1,2-DAG nachgewiesen, wobei keine Oxidation, Desaturation oder Elongation der Acyl-Reste stattfand (⑧). Für die Lipidklassen DAG und GPC, in welche die Octadecadiensäure metabolisch aufgenommen wird, wurde für die hochauflösenden massenspektrometrischen Untersuchungen eine Datenbank erstellt (⑨). Dadurch wurden die Lipidspezies als DAG (18:2 / 18:2), GPC (16:0 / 18:2) und GPC (18:2 / 18:2) identifiziert (⑩). Die metabolische Aufnahme von den in porcinen Spermatozoenlipiden vorkommenden 16:1, 18:1 und 18:3 wurde ebenfalls festgestellt während für 20:5, die endogen nicht vorkommt, hingegen kein metabolischer Einbau nachgewiesen wurde (4.3.6). Wenn in einem Markierungsexperiment das Substrat (Octadecadiensäure) nur kurzzeitig zu Verfügung stand, fand kein bevorzugter metabolischer Einbau in 1,2-DAG oder GPC statt und die Menge des aufgenommenen Substrates war in den beiden Lipidklassen etwa gleich. Bei einer kontinuierlichen Substratzufuhr erfolgte hingegen eine metabolische Aufnahme vor allem in 1,2-DAG. Die Supplementierung bei 17°C führt, verglichen mit der Supplementierung bei 6°C, zur Erhöhung der metabolischen Aufnahmerate der Octadecadiensäure und kann individuums- bzw. ejakulatspezifischen Einflüssen unterliegen. Die metabolische Aufnahme von Octadecadiensäure in die bakteriellen Lipide war bei der Niedrigtemperaturlagerung deutlich geringer. Dies deutet darauf hin, dass der bakterielle Stoffwechsel herabgesetzt wurde und dies zu einer Reduktion der bakteriellen Kontamination führte (4.4.3). Die Niedrigtemperaturlagerung beeinflusst jedoch auch die porcinen *Spermatozoen* (4.5.3-4.5.5). Durch den Zusatz der hier untersuchten Fettsäuren zum Flüssigkonservierungsmedium konnte, mit Ausnahme von Eicosapentaensäure, eine Verbesserung des physiologischen Zustandes im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben verzeichnet werden (4.5.3-4.5.5). Anhand der massenspektrometrischen Analysen wurde gezeigt, dass Eicosapentaensäure nicht metabolisch in die porcinen Spermatozoenlipide eingebaut wird (4.3.6). Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die Metabolisierung der Fettsäuren sowohl

zu einer Reduktion des Anteils akrosomdefekter *Spermatozoen* als auch zu einer Zunahme der Motilität führt.

Obwohl angenommen wird, dass die *Spermatozoen* ihre Fähigkeit zu Wachstum, Zellteilung, Fähigkeit zur Reparatur und Biosynthese in der abschließenden Phase der Spermatogenese verlieren und ausschließlich dem Zwecke der Fertilisation dienen (Yoshida, 2000), sind die *Spermatozoen* zu einer aktiven Lipidbiosynthese befähigt (Abb. 41). Erst nach dem Zusatz von ungesättigten, mittelkettigen Fettsäuren zu dem Flüssigkonservierungsmedium findet eine *de-novo* Generierung von ungesättigtem mittelkettigen 1,2-DAG, wobei die beiden Fettsäuren aus dem Supplementierungsmedium stammen (Abb. 41, I). Es ist bekannt, dass die Kältetoleranz der *Spermatozoen* durch den Anteil ungesättigter Acyl-Reste in den Membranlipiden moduliert wird (Arav et al., 2000). Daher kann angenommen werden, dass die Kältetoleranz auf der Membranenebene sowohl durch die *de-novo* Synthese von ungesättigtem 1,2-DAG als auch durch die Zunahme von bereits vorkommenden GPC mit ungesättigten Acyl-Resten erhöht wird (Abb. 41, II). Dies kann die allgemeine Verbesserung des physiologischen Zustandes der *Spermatozoen* bei der Niedrigtemperaturlagerung erklären (4.5.6).

Bei der Untersuchung der physiologischen Parameter wurde für alle Supplementierungsvarianten, mit Ausnahme von 20:5, eine Erhöhung des Anteils motiler und vitaler niedrigtemperaturgelagerter *Spermatozoen* festgestellt (4.5.3-4.5.4). Da bei dem Zusatz von 20:5 zu dem Flüssigkonservierungsmedium kein metabolischer Einbau in 1,2-DAG stattfindet (4.3.6), kann angenommen werden, dass die Auswirkung auf die Motilität und Vitalität durch das von den *Spermatozoen de-novo* synthetisierte DAG (16:1, 18:1, 18:2 und 18:3) zurück zu führen ist. DAG kann während der Kapazitation als Signalmolekül die Proteinkinase-C aktivieren und dies führt zur Akrosomreaktion (Baldi et al., 2000). Unter physiologischen Bedingungen entsteht DAG bei den *Spermatozoen* erst während der Kapazitation durch die Hydrolyse von GPL durch die phosphoinositol- oder durch die phosphocholinspezifische Phospholipase-C (O'Toole et al., 1996; Roldan, 1998; Roldan and Shi, 2007). Daher kann angenommen werden, dass die Zunahme des Anteils von motilen *Spermatozoen* auf eine *de-novo* Biosynthese von DAG, ohne die vorangegangene Hydrolyse von GPL zurück zu führen ist (Abb. 41, III). Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass die Zunahme des Anteil der gesamtmotilen

*Spermatozoen* nur in den 16:1, 18:1, 18:2 und 18:3-Supplementierungsvarianten beobachtet wurde. Bei den unbehandelten Kontrollproben und bei der Supplementierung mit 20:5 wurde hingegen keine Zunahme der Motilität beobachtet (4.5.3).

Unter physiologischen Bedingungen findet die Aufrechterhaltung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Calcium-Homöostase) statt. Ein Anstieg der intrazellulären Konzentration kann dazu führen, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, als Signalmoleküle, die Hydrolyse von GPL durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Phospholipasen- $\text{A}_2$  aktivieren können (Abb. 41, V). Die Hydrolyse von GPC zu Lyso-GPC und freie Fettsäure führt zur Vesikulation der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran und anschließend zur Freisetzung des akrosomalen Inhaltes (Abou-haila and Tulsiani, 2009; Flesch and Gadella, 2000; Regazzi and Tomes, 2007; Roldan and Shi, 2007). Während der Niedrigtemperaturlagerung von flüssigkonservierten *Spermatozoen* kann auf Grund der Reduktion des Stoffwechsels auch die Aktivität von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen herabgesetzt werden, wodurch die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration ansteigt. Dies führt zur Depolarisation der Zellmembran und kann anschließend die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aktivieren (Watson, 2000). Die metabolische Aufnahme von zum Medium zugesetzten Fettsäuren in die Lyso-GPC kann daher zur Verhinderung der Akrosomreaktion führen (Abb. 41, IV).

Diese Annahme wird dadurch gestärkt, dass trotz der Niedrigtemperaturlagerung keine Zunahme der akrosomalen Schäden, wie bei den unbehandelten Kontrollproben, beobachtet werden konnte (4.5.5).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den physiologischen Veränderungen porciner *Spermatozoen*, die durch einen metabolischen Einbau von Fettsäuren (Hexadecensäure, Octadecensäure, Octadecadiensäure, Octadecatriensäure, Eicosapentaensäure) in Spermatozoenlipide hervorgerufen werden. Zu Konservierungszwecken werden den *Spermatozoen* seit Jahrzehnten empirisch lipid- und fettsäurehaltige Substanzen als Kryoprotektiva zugefügt, die genaue molekulare Wirkungsweise ist jedoch *bis dato* nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war daher sowohl die Untersuchung der metabolischen Aufnahme von Fettsäuren in die Spermatozoenlipide als auch die Bewertung des physiologischen Zustandes porciner *Spermatozoen* mit Hinblick auf die Niedrigtemperaturlagerung. Die Niedrigtemperaturlagerung von *Spermatozoen* bei 4 bis 6°C führt zu einer Reduktion der bakteriellen Kontamination und soll daher eine Verringerung von Antibiotikazusätzen gestatten, was wiederum künftig die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen einschränken soll. Insbesondere für die sehr kälteempfindlichen porcinen *Spermatozoen* ist eine Lagerung bei 6°C allerdings mit erheblichen Verlusten der Vitalität verbunden. Im ersten Teil der Arbeit wurden alle in den porcinen *Spermatozoen* vorkommenden Lipide und die Fettsäuren mittels GC und MALDI-TOF-MS analysiert und eine detaillierte Lipid-Datenbank erstellt. Hauptvertreter der polaren Lipidklassen sind Glycerophospholipide (GPC, GPE), mit hauptsächlich ungesättigten, mittel- und langkettigen Fettsäuren und Fettaldehyden. Der Hauptvertreter der neutralen Lipidklassen ist Diacylglycerol (1,2-DAG) mit mittlerer Kettenlänge und hauptsächlich gesättigten Resten. Es wurde gezeigt, dass beispielsweise Octadecadiensäure in der gesamten GPC-Klasse porciner *Spermatozoen* mit ca. 15 mol% endogen vorkommt.

Die metabolische Aufnahme von Fettsäuren in die Lipide wurde exemplarisch durch die Supplementierung des Flüssigkonservierungsmediums mit [1-<sup>14</sup>C]-Octadecadiensäure radiochemisch untersucht. Anhand dieser Experimente wurde gezeigt, dass die Temperatur und die Inkubationsdauer wichtige Faktoren für die metabolische Aufnahme dieser Radiochemikalie in die Spermatozoenlipide sind. Die zugesetzten Fettsäuren werden sowohl in die neutralen (1,2-DAG) als auch in die polaren Lipide (*diacyl*-GPC) der *Spermatozoen* eingebaut. Nach Supplementierung mit einheitlich <sup>13</sup>C-markierter Octadecadiensäure wurden die betroffenen Lipide

mittels MALDI-TOF-MS und Q-TOF-MS als DAG (18:2 / 18:2), GPC (16:0 / 18:2) und GPC (18:2 / 18:2) charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei DAG (18:2 / 18:2) um eine *de-novo* Biosynthese handelt. Die gleichen Ergebnisse wurden auch für die in den Spermatozoenlipiden vorkommenden Hexadecen-, Octadecen-, und Octadecatriensäure erhalten. Die chemische Supplementierung mit der in porcinen *Spermatozoen* endogen nicht vorkommender Eicosapentaensäure führte hingegen zu keiner metabolischen Aufnahme in die Lipide. Bei der Untersuchung des physiologischen Zustandes von *Spermatozoen* wurde gezeigt, dass insbesondere Supplementierungsvarianten mit endogen vorkommenden Fettsäuren im Vergleich zur Kontrolle ohne Supplementierung zu einer besseren Spermatozoenvitalität und Motilität bei Niedrigtemperaturlagerung führten. Gleichzeitig wurde eine Verminderung des Auftretens von akrosomalen Schäden festgestellt. Hexadecensäure stabilisierte die alle Vitalitätsparameter signifikant. Damit stellt eine Supplementierung der *Spermatozoen* mit ausgewählten Fettsäuren eine effektive Maßnahme zur Lagerung von *Spermatozoen* bei 4 bis 6°C dar, so dass langfristig die Reduzierung von Antibiotikazusätzen bei der Flüssigkonservierung möglich wird.

### 6 AUSBLICK

Die zum Flüssigkonservierungsmedium zugesetzten Fettsäuren, die endogen in den *Spermatozoen* vorkommen, werden in die Spermatozoenlipide metabolisch aufgenommen. Insbesondere die Metabolisierung von Octadecadiensäure wurde in dieser Arbeit exemplarisch ausführlich beschrieben. In Analogie sollten in nachfolgenden Arbeiten weitere Fettsäuren (vor allem die Hexadecensäure) und auch andere Lipidkomponenten (z.B. Cholinphosphat, Glycerin) im Hinblick auf die Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der *Spermatozoen* bei Niedrigtemperaturlagerung untersucht werden. Als Grundlage wären Untersuchungen zu Zytotoxizität, Bioverfügbarkeit und Verabreichungsmethoden dieser Substanzen durchzuführen. Die physiologischen Auswirkungen neuer Komponenten des Flüssigkonservierungsmediums während der Niedrigtemperaturlagerung müssten begleitend dokumentiert werden. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit vorgenommenen Aussagen zu Parametern der Spermaqualität, wären mögliche Effekte auf die Befruchtungsfähigkeit der Spermien, die Embryogenese sowie die weitere Entwicklung von Trächtigkeiten und Nachkommen zu untersuchen. Eine detailliertere Analyse der Metabolisierung exogen verfügbarer Fettsäuren durch die *Spermatozoen* und die Bestimmung der relevanten Enzyme, Transporter etc. sollte perspektivisch auch zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Supplementierung bezüglich der Spermatozoenvitalität beitragen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abou-haila, A., and Tulsiani, D.R. (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys* 485, 72-81.
- Althouse, G.C. (2008). Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2, 374-378.
- Althouse, G.C., and Lu, K.G. (2005). Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63, 573-584.
- Althouse, G.C., Pierdon, M.S., and Lu, K.G. (2008). Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology* 70, 1317-1323.
- Am-In, N., Kirkwood, R.N., Techakumphu, M., and Tantasuparuk, W. (2011). Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology* 75, 897-903.
- Amidi, F., Farshad, A., and Khor, A.K. (2010). Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology* 61, 94-99.
- Ansell, G.B., and Spanner, S. (1982). Phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. In Hawthorne J. N., Ansell G. B.(eds): "Phospholipids" (Amsterdam; Oxford, Elsevier Biomedical).
- Arav, A., Pearl, M., and Zeron, Y. (2000). Does membrane lipid profile explain chilling sensitivity and membrane lipid phase transition of spermatozoa and oocytes? *Cryo Letters* 21, 179-186.
- Arnhold, J., Panasenko, O.M., Schiller, J., Vladimirov Yu, A., and Arnold, K. (1995). The action of hypochlorous acid on phosphatidylcholine liposomes in dependence on the content of double bonds. Stoichiometry and NMR analysis. *Chem Phys Lipids* 78, 55-64.
- Austin, C.R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326.
- Aveldano, M.I., Rotstein, N.P., and Vermouth, N.T. (1992). Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochem J* 283 (1), 235-241.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C., and Forti, G. (1996). Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Frontiers in Bioscience* 1, d189-205.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Muratori, M., and Forti, G. (2000). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience* 1, E110-123.
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., and Lenaz, G. (2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1606, 137-146.
- Bathgate, R., Maxwell, W.M., and Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim* 41, 68-73.
- Bedford, J.M., and Hoskins, D.D. (1990). The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In Marshall's Physiology of Reproduction, 4th Edn Vol. 2, pp 379-568.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Binder, R., and Archimbaud, Y. (2000). Sensitivity of radioluminography using (14)C-labeled tracers in whole-body sections of rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 31, 23-26.
- Bishop, W.R., and Bell, R.M. (1988). Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu Rev Cell Biol* 4, 579-610.
- Black, P.N., and DiRusso, C.C. (1994). Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1210, 123-145.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Bower, K. (2003). When to use Fisher's exact test. *American Society for Quality, Six Sigma Forum Magazine* 2, 35-37.
- Boyers, S.P. (1989). Fertilization and implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1, 45-54.
- Browse, J., McCourt, P.J., and Somerville, C.R. (1986). Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal Biochem* 152, 141-145.
- Buhr, M.M., Curtis, E.F., and Kakuda, N.S. (1994). Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31, 224-238.
- Busch, W. (2001). *Veterinärmedizinische Andrologie : Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*; Stuttgart; New York, Schattauer.
- Castellano, C.A., Audet, I., Bailey, J.L., Laforest, J.P., and Matte, J.J. (2010). Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 degrees C or cryopreserved. *Theriogenology* 74, 1482-1490.
- Castro, P.M.L., Ison, A.P., Hayter, P.M., and Bull, A.T. (1995). CHO cell growth and recombinant interferon- $\gamma$  production: Effects of BSA, Pluronic and lipids. *Cytotechnology* 19, 27-36.
- Chakrabarty, J., Banerjee, D., Pal, D., De, J., Ghosh, A., and Majumder, G.C. (2007). Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology* 54, 27-35.
- Chambers, J.M., Cleveland, W.S., Kleiner, B., and Tukey, P. (1983). *Graphical methods for data analysis* (Duxbury Press).
- Chen, W.Y., Xu, W.M., Chen, Z.H., Ni, Y., Yuan, Y.Y., Zhou, S.C., Zhou, W.W., Tsang, L.L., Chung, Y.W., Hoglund, P., et al. (2009). Cl<sup>-</sup> is required for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> entry necessary for sperm capacitation in guinea pig: involvement of a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger (SLC26A3) and CFTR. *Biol Reprod* 80, 115-123.
- Cheng, T.-K., W. (1985). *In vitro* fertilization of farm animal oocytes. Thesis (doctoral) Cambridge, Agricultural and Food Research Council.
- Cherian, G. (2008). Egg quality and yolk polyunsaturated fatty acid status in relation to broiler breeder hen age and dietary n-3 oils. *Poult Sci* 87, 1131-1137.
- Choi, Y.H., and Toyoda, Y. (1998). Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biol Reprod* 59, 1328-1333.
- Clegg, E.D., and Foote, R.H. (1973). Phospholipid composition of bovine sperm fractions, seminal plasma and cytoplasmic droplets. *J Reprod Fertil* 34, 379-383.
- Cooper, T.G. (1996). Epididymis and sperm function. *Andrologia* 28 Suppl 1, 57-59.
- Cooper, T.G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl* 13, 130-138.

- Crossley, A., Freeman, I.P., Hudson, B.J.F., and Pierce, J.H. (1959). Acyl migration in diglycerides. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 760-764.
- Curry, M.R., and Watson, P.F. (1995). Sperm structure and function. In *Cambridge Reviews in Reproduction Vol1 Gametes – The Spermatozoon* Eds JG Grudzinskas, JL Yovich, JL Simpson & TChard, Cambridge University Press (Cambridge), 45-69.
- Dapino, D.G., Marini, P.E., and Cabada, M.O. (2006). Effect of heparin on in vitro capacitation of boar sperm. *Biol Res* 39, 631-639.
- Devaiah, S.P., Roth, M.R., Baughman, E., Li, M., Tamura, P., Jeannotte, R., Welti, R., and Wang, X. (2006). Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type Arabidopsis and a PHOSPHOLIPASE Dα1 knockout mutant. *Phytochemistry* 67, 1907-1924.
- Di Paola, M., and Lorusso, M. (2006). Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1330-1337.
- Di Paola, M., Zaccagnino, P., Oliveros-Celis, C., and Lorusso, M. (2006). Arachidonic acid induces specific membrane permeability increase in heart mitochondria. *FEBS Lett* 580, 775-781.
- Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I., and Benning, C. (1995). Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell* 7, 1801-1810.
- Du Mesnil du Buisson, F., and Dauzier, L. (1959). Improvement of practical use of preservation techniques for boar semen by saturation of the diluent with carbondioxide. *Ann Zootech Suppl* 8, 81-96.
- Ekhlesi-Hundrieser, M. (2010). Habilitationsschrift: "Struktur-Funktionsbeziehungen spermienbindender Proteine des männlichen Reproduktionstrakts beim Säuger". In *Tierärztliche Hochschule (Hannover)*.
- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Thomas, C.A., Downing, T.W., and Marshall, C.E. (1993). Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 39, 1009-1024.
- Evans, R.W., Weaver, D.E., and Clegg, E.D. (1980). Diacyl, alkenyl, and alkyl ether phospholipids in ejaculated, in utero-, and in vitro-incubated porcine spermatozoa. *J Lipid Res* 21, 223-228.
- Fagan, P., Wijesundera, C., and Watkins, P. (2004). Determination of mono- and di-acylglycerols in milk lipids. *J Chromatogr A* 1054, 251-259.
- Farstad, W. (2009). Cryopreservation of canine semen - new challenges. *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 2, 336-341.
- Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F., and Holt, W.V. (1999). Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* 60, 879-886.
- Feki, N.C., Therond, P., Couturier, M., Limea, G., Legrand, A., Jouannet, P., and Auger, J. (2004). Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. *Mol Hum Reprod* 10, 137-142.
- Flesch, F.M., and Gadella, B.M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1469, 197-235.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.

- Fuchs, B., Jakop, U., Goritz, F., Hermes, R., Hildebrandt, T., Schiller, J., and Müller, K. (2009). MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. *Theriogenology* 71, 568-575.
- Fuchs, B., Schiller, J., Suss, R., Schurenberg, M., and Suckau, D. (2007). A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Anal Bioanal Chem* 389, 827-834.
- Fuchs, B., Suss, R., Teuber, K., Eibisch, M., and Schiller, J. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state. *J Chromatogr A* 1218, 2754-2774.
- Fujita, Y., Matsuoka, H., and Hirooka, K. (2007). Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol Microbiol* 66, 829-839.
- Gadea, J. (2003). Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine Spanish *Journal of Agricultural Research* 1, 17-27.
- Gadea, J. (2005). Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63, 431-444.
- Garner, D.L., Pinkel, D., Johnson, L.A., and Pace, M.M. (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod* 34, 127-138.
- Garner, D.L., Thomas, C.A., Joerg, H.W., DeJarnette, J.M., and Marshall, C.E. (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 57, 1401-1406.
- Gather, U., and Pawlitschko, J. (2006). Outlier Detection. In *Encyclopedia of Actuarial Science* (John Wiley & Sons, Ltd).
- Gee, P.T., and Goh, S.H. (2001). Dietary and chiral diacylglycerols. *Malaysian Oil Science and Technology* 10, 49-50.
- Gertz, C., and Fiebig, H.-J. (2006). Isomeric diacylglycerols – Determination of 1,2- and 1,3-diacylglycerols in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 1066-1069.
- Gibellini, F., and Smith, T.K. (2010). The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 62, 414-428.
- Gidden, J., Liyanage, R., Durham, B., and Lay, J.O., Jr. (2007). Reducing fragmentation observed in the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of triacylglycerols in vegetable oils. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 1951-1957.
- Glass, R.L., Krick, T.P., and Echardt, A.E. (1974). New series of fatty acids in northern pike (*Esox lucius*). *Lipids* 9, 1004-1008.
- Go, K.J., and Wolf, D.P. (1985). Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 32, 145-153.
- Gómez-Fernández, J.C., and Corbalán-García, S. (2007). Diacylglycerols, multivalent membrane modulators. *Chemistry and Physics of Lipids* 148, 1-25.
- Gottardi L., B.L., Zanelli L. (1980). New dilution media for artificial insemination in the pig. 9th ICAR Madrid 5, 49-53.
- Graham, J.K., Kunze, E., and Hammerstedt, R.H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43, 55-64.

- Gulaya, N.M., Margitich, V.M., Govseeva, N.M., Klimashevsky, V.M., Gorpynchenko, II, and Boyko, M.I. (2001). Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Arch Androl* 46, 169-175.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., and Dijkstra, A.J. (2007). *The lipid handbook*, 3rd ed. edn (CRC; London: Taylor & Francis).
- Gupta, A., Mahdi, A.A., Ahmad, M.K., Shukla, K.K., Jaiswer, S.P., and Shankhwar, S.N. (2011). <sup>1</sup>H NMR spectroscopic studies on human seminal plasma: a probative discriminant function analysis classification model. *J Pharm Biomed Anal* 54, 106-113.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., and Frayn, K.N. (2002). *Lipid biochemistry*, 5th edn (Oxford, Blackwell Science, 267-276).
- Hamilton, D.W., and Olson, G.E. (1976). Effects of carnitine on oxygen uptake and utilization of (U-<sup>14</sup>C)palmitate by ejaculated bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 46, 195-202.
- Hammerstedt, R.H., Hay, S.R., and Amann, R.P. (1982). Modification of ram sperm membranes during epididymal transit. *Biol Reprod* 27, 745-754.
- Hansen, C., Vermeiden, T., Vermeiden, J.P., Simmet, C., Day, B.C., and Feitsma, H. (2006). Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology* 66, 2188-2194.
- Hawrot, E., and Kennedy, E.P. (1975). Biogenesis of membrane lipids: mutants of *Escherichia coli* with temperature-sensitive phosphatidylserine decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1112-1116.
- Henault, M.A., and Killian, G.J. (1993a). Composition and morphology of lipid droplets from oviduct epithelial cells. *Anat Rec* 237, 466-474.
- Henault, M.A., and Killian, G.J. (1993b). Neutral lipid droplets in bovine oviductal epithelium and lipid composition of epithelial cell homogenates. *J Dairy Sci* 76, 691-700.
- Henault, M.A., and Killian, G.J. (1993c). Synthesis and secretion of lipids by bovine oviduct mucosal explants. *J Reprod Fertil* 98, 431-438.
- Hjelmstad, R.H., and Bell, R.M. (1991). Molecular insights into enzymes of membrane bilayer assembly. *Biochemistry* 30, 1731-1740.
- Hoaglin, D.C., Mosteller, F., and Tukey, J.W. (1983). *Understanding robust and exploratory data analysis* (New York ; Chichester, Wiley).
- Hochi, S., Kimura, K., and Hanada, A. (1999). Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology* 52, 497-504.
- Hölzl, G. (2005). Veränderung des Glykolipidmusters in Thylakoiden von Pflanzen und Blaualgen durch heterologe Expression bakterieller Glykosyltransferasen. In Universität Hamburg, FB Biologie.
- Hosek, J., Zavalova, V., and Kollar, P. (2010). Effect of solvent on cytotoxicity and bioavailability of fatty acids. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32, 462-465.
- Hossain, M., Hyeong, L., Miah, A., and Tsujii, H. (2007a). Effect of fatty acids bound to bovine serum albumin-V on acrosome reaction and utilization of glucose in boar spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology* 6, 109-115.
- Hossain, S., Tareq, K., Hammano, K.-I., and Tsujii, H. (2007b). Effect of fatty acids on boar sperm motility viability and acrosome reaction. *Reproductive Medicine and Biology* 6, 235-239.

- Hou, C.T. (1994). Production of 10-Ketostearic Acid from Oleic Acid by *Flavobacterium* sp. Strain DS5 (NRRL B-14859). *Appl Environ Microbiol* 60, 3760-3763.
- Hou, C.T. (2000). Biotransformation of unsaturated fatty acids to industrial products. *Adv Appl Microbiol* 47, 201-220.
- Hou, C.T., Brown, W., Labeda, D.P., Abbott, T.P., and Weisleder, D. (1997). Microbial production of a novel trihydroxy unsaturated fatty acid from linoleic acid. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19, 34-38.
- Ichihara, K.i., and Noda, M. (1982). Some properties of diacylglycerol acyltransferase in a particulate fraction from maturing safflower seeds. *Phytochemistry* 21, 1895-1901.
- Imahori, Y., Ohmori, Y., Fujii, R., Matsumoto, K., and Ueda, S. (1995). Rapid incorporation of carbon-11-labeled diacylglycerol as a probe of signal transduction in glioma. *Cancer Res* 55, 4225-4229.
- Imamura, S., Ueda, S., Mizugaki, M., and Kawaguchi, A. (1990). Purification of the multienzyme complex for fatty acid oxidation from *Pseudomonas fragi* and reconstitution of the fatty acid oxidation system. *J Biochem* 107, 184-189.
- Iritani, A., Gomes, W.R., and Vandemark, N.L. (1969). Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biol Reprod* 1, 72-76.
- Ishikawa, M., Mikami, Y., Usukura, J., Iwasaki, H., Shinagawa, H., and Morikawa, K. (1997). Reconstitution, morphology and crystallization of a fatty acid beta-oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas fragi*. *Biochem J* 328 ( Pt 3), 815-820.
- Ishizuka, I., Suzuki, M., and Yamakawa, T. (1973). Isolation and characterization of a novel sulfoglycolipid, 'seminolipid,' from boar testis and spermatozoa. *J Biochem* 73, 77-87.
- Jin, J.Y., Chen, W.Y., Zhou, C.X., Chen, Z.H., Yu-Ying, Y., Ni, Y., Chan, H.C., and Shi, Q.X. (2009). Activation of GABAA receptor/Cl<sup>-</sup> channel and capacitation in rat spermatozoa: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> are essential. *Syst Biol Reprod Med* 55, 97-108.
- Kalic, M., Kamp, G., and Lauterwein, J. (1997). Nuclear magnetic resonance studies of boar seminal plasma. Problems encountered in the identification of small molecules: hypotaurine and carnitine. *NMR Biomed* 10, 341-347.
- Kalo, P.J., Ollilainen, V., Rocha, J.M., and Malcata, F.X. (2006). Identification of molecular species of simple lipids by normal phase liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry, and application of developed methods in comprehensive analysis of low erucic acid rapeseed oil lipids. *Int J Mass Spectrom* 254, 106-121.
- Kaur, S., Prabha, V., and Sarwal, A. (2010). Receptor mediated agglutination of human spermatozoa by spermagglutinating factor isolated from *Staphylococcus aureus*. *J Urol* 184, 2586-2590.
- Kluytmans, J.H., and Zandee, D.I. (1973). Lipid metabolism in the northern pike (*Esox lucius* L.). 1. The fatty composition of the northern pike. *Comp Biochem Physiol B* 44, 451-458.
- Kodali, D.R., Tercyak, A., Fahey, D.A., and Small, D.M. (1990). Acyl migration in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol. *Chem Phys Lipids* 52, 163-170.
- Kongmanas, K., Xu, H., Yaghoubian, A., Franchini, L., Panza, L., Ronchetti, F., Faull, K., and Tanphaichitr, N. (2010). Quantification of seminolipid by LC-ESI-MS/MS-multiple reaction monitoring: compensatory levels in Cgt(+/-) mice. *J Lipid Res* 51, 3548-3558.
- Kramer, R.Y., Garner, D.L., Bruns, E.S., Ericsson, S.A., and Prins, G.S. (1993). Comparison of motility and flow cytometric assessments of seminal quality in fresh, 24-hour extended and cryopreserved human spermatozoa. *J Androl* 14, 374-384.
- Kraus, M., Ticha, M., Zelezna, B., Peknicova, J., and Jonakova, V. (2005). Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *J Reprod Immunol* 65, 33-46.

Krummenauer, F., Wojciechowski, C., Baulig, C., and Al-Nawas, B. (2007). Boxplots – die flexible Alternative zum „Antennen-Bildchen“. *Z Zahnärztl Implantol* Bd. 23, 308-311.

Kuhnt, S., and Pawlitschko, J. (2005). Outlier Identification Rules for Generalized Linear Models. *Innovations in Classification, Data Science and Information Systems*, 165-172.

Kumar, S., Millar, J.D., and Watson, P.F. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46, 246-253.

Kurz, A. (2005). Organisation und Dynamik der Phospholipide in der Zell- und Akrosommembran von Eberspermien während der Kapazitation und Akrosomreaktion. In *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät II* (Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin).

Leiding, C. (2005). Ebersamenverdünner – Stand der Technologie. In *Züchtungskunde* 77, Bd.2, Eugen Ulmer Verlag GmbH & Co., Stuttgart, 151-156.

Lenzi, A., Gandini, L., Lombardo, F., Picardo, M., Maresca, V., Panfili, E., Tramer, F., Boitani, C., and Dondero, F. (2002). Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception* 65, 301-304.

Lenzi, A., Gandini, L., Picardo, M., Tramer, F., Sandri, G., and Panfili, E. (2000). Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. *Front Biosci* 5, E1-E15.

Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., and Dondero, F. (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 2, 246-256.

Lessig, J., Gey, C., Suss, R., Schiller, J., Glander, H.J., and Arnhold, J. (2004). Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137, 265-277.

Lessig, J., Schiller, J., Arnhold, J., and Fuchs, B. (2007). Hypochlorous acid-mediated generation of glycerophosphocholine from unsaturated plasmalogen glycerophosphocholine lipids. *J Lipid Res* 48, 1316-1324.

Lindenthal, B., Aldaghlis, T.A., Kelleher, J.K., Henkel, S.M., Tolba, R., Haidl, G., and von Bergmann, K. (2001). Neutral sterols of rat epididymis. High concentrations of dehydrocholesterols in rat caput epididymidis. *J Lipid Res* 42, 1089-1095.

Lubary, M., Hofland, G.W., and ter Horst, J.H. (2011). A process for the production of a diacylglycerol-based milk fat analogue. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 459-468.

Mackie, A.R., James, P.S., Ladha, S., and Jones, R. (2001). Diffusion barriers in ram and boar sperm plasma membranes: directionality of lipid diffusion across the posterior ring. *Biol Reprod* 64, 113-119.

Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T., Cerolini, S., Penny, P., and Noble, R. (2005). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63, 411-421.

Mann, T., and Lutwak-Mann, C. (1981). *Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology* (Berlin; New York, Springer-Verlag).

Mann, T., and Lutwak-Mann, C. (1982). Passage of chemicals into human and animal semen: mechanisms and significance. *Crit Rev Toxicol* 11, 1-14.

Matsunaga, I., Sumimoto, T., Ueda, A., Kusunose, E., and Ichihara, K. (2000). Fatty acid-specific, regiospecific, and stereospecific hydroxylation by cytochrome P450 (CYP152B1) from *Sphingomonas paucimobilis*: substrate structure required for alpha-hydroxylation. *Lipids* 35, 365-371.

- Maxwell, W.M., and Johnson, L.A. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 46, 408-418.
- Mazzella, N., Molinet, J., Syakti, A.D., Dodi, A., Doumenq, P., Artaud, J., and Bertrand, J.C. (2004). Bacterial phospholipid molecular species analysis by ion-pair reversed-phase HPLC/ESI/MS. *J Lipid Res* 45, 1355-1363.
- Medeiros, C.M., Forell, F., Oliveira, A.T., and Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327-344.
- Medrano, A., Holt, W.V., and Watson, P.F. (2009). Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Andrologia* 41, 246-250.
- Monga, M., and Roberts, J.A. (1994). Spermagglutination by bacteria: receptor-specific interactions. *J Androl* 15, 151-156.
- Morita, Y.S., Fukuda, T., Sena, C.B.C., Yamaryo-Botte, Y., McConville, M.J., and Kinoshita, T. (2011). Inositol lipid metabolism in mycobacteria: Biosynthesis and regulatory mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1810, 630-641.
- Morreti, J. (1981). Artificial insemination of swine: fertility using several liquid semen diluents (cited by Johnson L.A., Aalberts J.G., 1984). 8th IPVS Congress Ghent, Belgium, 293.
- Mourvaki, E., Cardinali, R., Dal Bosco, A., Corazzi, L., and Castellini, C. (2010). Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. *Theriogenology* 73, 629-637.
- Neill, A.R., and Masters, C.J. (1971). Incorporation of (U-14C)palmitic acid into the phospholipids of bovine semen. *J Reprod Fertil* 24, 295-297.
- Neill, A.R., and Masters, C.J. (1972). Metabolism of fatty acids by bovine spermatozoa. *Biochem J* 127, 375-385.
- Neill, A.R., and Masters, C.J. (1973). Metabolism of fatty acids by ovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 34, 279-287.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D.A., and Vary, J.C. (1985). Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 815, 486-498.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D.A., and Vary, J.C. (1986). Modulation of the lipid composition of boar sperm plasma membranes during an acrosome reaction in vitro. *Arch Biochem Biophys* 250, 30-37.
- O'Leary, W.M., and Wilkinson, S.G. (1988). Gram-positive bacteria. In *Microbial lipids*. C Ratlidge and S G Wilkinson, editors, *Microbial lipids Vol 1* Academic Press, London, UK, 117-201.
- O'Toole, C.M., Roldan, E.R., Hampton, P., and Fraser, L.R. (1996). A role for diacylglycerol in human sperm acrosomal exocytosis. *Mol Hum Reprod* 2, 317-326.
- Oberle, V. (1999). Untersuchungen zum Einfluß freier Fettsäuren auf die Eigenschaften biologischer und Modellmembranen (Halle (Saale) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation).
- Okazaki, T., Mihara, T., Fujita, Y., Yoshida, S., Teshima, H., and Shimada, M. (2010). Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology* 74, 1691-1700.
- Papaioannou, K.Z., Murphy, R.P., Monks, R.S., Hynes, N., Ryan, M.P., Boland, M.P., and Roche, J.F. (1997). Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Theriogenology* 48, 299-312.
- Parks, J.E., and Lynch, D.V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, 255-266.

- Peitz, B., and Olds-Clarke, P. (1986). Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol Reprod* 35, 608-617.
- Pelech, S.L., and Vance, D.E. (1984). Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 779, 217-251.
- Petrunkina, A.M., Waberski, D., Gunzel-Apel, A.R., and Topfer-Petersen, E. (2007). Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134, 3-17.
- Pie, A., and Giner, A. (1966). Solvents for thin layer chromatography of blood serum lipids. *Nature* 212, 402-403.
- Pintado, B., de la Fuente, J., and Roldan, E.R. (2000). Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J Reprod Fertil* 118, 145-152.
- Plisko, N.T. (1965). A method for prolonging the viability and fertilizing ability of boar spermatozoa. *Svinovodstvo* 9, 37-41.
- Poulos, A., Sharp, P., Johnson, D., White, I., and Fellenberg, A. (1986). The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than 22 carbon atoms in mammalian spermatozoa. *Biochem J* 240, 891-895.
- Pursel, V.G., and Johnson, L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 40, 99-102.
- Qian, M., and Eaton, J.W. (1994). Free fatty acids enhance hypochlorous acid production by activated neutrophils. *J Lab Clin Med* 124, 86-95.
- Queen, K., Dhabuwala, C.B., and Pierrepoint, C.G. (1981). The effect of the removal of the various accessory sex glands on the fertility of male rats. *J Reprod Fertil* 62, 423-426.
- Realini, C.E., Duran-Montge, P., Lizardo, R., Gispert, M., Oliver, M.A., and Esteve-Garcia, E. (2010). Effect of source of dietary fat on pig performance, carcass characteristics and carcass fat content, distribution and fatty acid composition. *Meat Sci* 85, 606-612.
- Regazzi, R., and Tomes, C.N. (2007). Acrosomal Exocytosis. In *Molecular Mechanisms of Exocytosis* (Springer New York), pp. 117-147.
- Revell, S.G., and Glossop, C.E. (1989). A long-time ambient temperature diluent for boar semen. *Animal Production* 48, 579-584.
- Ribbes, H., Plantavid, M., Bennet, P.J., Chap, H., and Douste-Blazy, L. (1987). Phospholipase C from human sperm specific for phosphoinositides. *Biochim Biophys Acta* 919, 245-254.
- Robinson, B.S., Johnson, D.W., and Poulos, A. (1992). Novel molecular species of sphingomyelin containing 2-hydroxylated polyenoic very-long-chain fatty acids in mammalian testes and spermatozoa. *J Biol Chem* 267, 1746-1751.
- Rodemer, C., Thai, T.P., Brugger, B., Gorgas, K., and Just, W. (2003a). Targeted disruption of ether lipid synthesis in mice. *Adv Exp Med Biol* 544, 355-368.
- Rodemer, C., Thai, T.P., Brugger, B., Kaercher, T., Werner, H., Nave, K.A., Wieland, F., Gorgas, K., and Just, W.W. (2003b). Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. *Hum Mol Genet* 12, 1881-1895.
- Roldan, E.R. (1998). Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 3, D1109-1119.
- Roldan, E.R., and Fragio, C. (1994). Diradylglycerols stimulate phospholipase A2 and subsequent exocytosis in ram spermatozoa. Evidence that the effect is not mediated via protein kinase C. *Biochem J* 297 (1), 225-232.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Roldan, E.R., and Harrison, R.A. (1990). Diacylglycerol and phosphatidate production and the exocytosis of the sperm acrosome. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 8-15.
- Roldan, E.R., and Harrison, R.A. (1992). The role of diacylglycerol in the exocytosis of the sperm acrosome. Studies using diacylglycerol lipase and diacylglycerol kinase inhibitors and exogenous diacylglycerols. *Biochem J* 281 (3), 767-773.
- Roldan, E.R., and Harrison, R.A. (1993). Diacylglycerol in the exocytosis of the mammalian sperm acrosome. *Biochem Soc Trans* 21, 284-289.
- Roldan, E.R., Martinez-Dalmau, R., and Mollinedo, F. (1994). Diacylglycerol and alkylacylglycerol stimulate ram sperm phospholipase A2. *Int J Biochem* 26, 951-958.
- Roldan, E.R., and Murase, T. (1994). Polyphosphoinositide-derived diacylglycerol stimulates the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C during exocytosis of the ram sperm acrosome. Effect is not mediated by protein kinase C. *J Biol Chem* 269, 23583-23589.
- Roldan, E.R., and Shi, Q.X. (2007). Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 12, 89-104.
- Rudkowska, I., Roynette, C.E., Demonty, I., Vanstone, C.A., Jew, S., and Jones, P.J. (2005). Diacylglycerol: efficacy and mechanism of action of an anti-obesity agent. *Obes Res* 13, 1864-1876.
- Rüsse, I., and Sinowatz, F. (1998). Gametogenese. In: „Lehrbuch der Embryologie der Haustiere“, I. Rüsse, and F. Sinowatz, eds. (Berlin, Blackwell).
- Rusu, A.-V., Miclea, V., and Zahan, M. (2011). Egg Yolk Protective Effect in Boar Spermatozoa Cooled at 5°C. *Animal Science and Biotechnologies* 44, 447-452.
- Sanchez-Migallon, M.P., Aranda, F.J., and Gomez-Fernandez, J.C. (1995). The dissimilar effect of diacylglycerols on Ca(2+)-induced phosphatidylserine vesicle fusion. *Biophys J* 68, 558-566.
- Scherer, S., and Neuhaus, K. (2006). Life at Low Temperatures. In *The Prokaryotes*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. (Springer New York), pp. 210-262.
- Schiller, J., Arnhold, J., Benard, S., Müller, M., Reichl, S., and Arnold, K. (1999). Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach. *Anal Biochem* 267, 46-56.
- Schiller, J., Müller, K., Suss, R., Arnhold, J., Gey, C., Herrmann, A., Lessig, J., Arnold, K., and Müller, P. (2003). Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry--a cautionary note. *Chem Phys Lipids* 126, 85-94.
- Schiller, J., Suss, R., Fuchs, B., Müller, M., Zschornig, O., and Arnold, K. (2007). MALDI-TOF MS in lipidomics. *Front Biosci* 12, 2568-2579.
- Schonfeld, P., and Wojtczak, L. (2008). Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 45, 231-241.
- Schulz, H. (2004). Fatty Acid Oxidation. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*, J.L. William, and M.D. Lane, eds. (New York, Elsevier), pp. 90-94.
- Schulze, M. (2010). Effect of antimicrobial peptides (AMP) in boar sperm preservation (Freie Universität Berlin, Doctoral thesis), pp. IV, 89 S.
- Schwenk, R.W., Holloway, G.P., Luiken, J.J., Bonen, A., and Glatz, J.F. (2010). Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82, 149-154.

- Seki, N., Toyama, Y., and Nagano, T. (1992). Changes in the distribution of filipin-sterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus. *Anat Rec* 232, 221-230.
- Selivonchick, D.P., Schmid, P.C., Natarajan, V., and Schmid, H.H. (1980). Structure and metabolism of phospholipids in bovine epididymal spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 618, 242-254.
- Shadan, S., James, P.S., Howes, E.A., and Jones, R. (2004). Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 71, 253-265.
- Shears, S.B. (1993). Regulation of the metabolism of 1,2-diacylglycerols and inositol phosphates that respond to receptor activation. In Taylor, Colin W. (Eds): *Intracellular messengers*. International encyclopedia of pharmacology and therapeutics. (Oxford, Pergamon: 315-346).
- Shereena, K.M., and Thangaraj, T. (2009). Biodiesel: An Alternative fuel Produced from Vegetable Oils by Transesterification. *Electronic Journal of Biology* 5, 67-74.
- Sidhu, K.S., and Guraya, S.S. (1989). Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol* 118, 231-280.
- Spengler, B., Kirsch, D., Kaufmann, R., and Cotter, R.J. (1991). Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5, 198-202.
- Storey, B.T. (1995). Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reprod Fertil Dev* 7, 927-942.
- Strzezek, J., Fraser, L., Kuklinska, M., Dziekonska, A., and Lecewicz, M. (2004). Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod Biol* 4, 271-287.
- Suarez, S., Redfern, K., Raynor, P., Martin, F., and Phillips, D.M. (1991). Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol Reprod* 44, 998-1004.
- Tannert, A., Kurz, A., Erlemann, K.R., Müller, K., Herrmann, A., Schiller, J., Topfer-Petersen, E., Manjunath, P., and Müller, P. (2007a). The bovine seminal plasma protein PDC-109 extracts phosphorylcholine-containing lipids from the outer membrane leaflet. *Eur Biophys J* 36, 461-475.
- Tannert, A., Topfer-Petersen, E., Herrmann, A., Müller, K., and Müller, P. (2007b). The lipid composition modulates the influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on membrane stability. *Biochemistry* 46, 11621-11629.
- Terner, C., and Korsh, G. (1962). The biosynthesis of C-14-labeled lipids by isolated bull spermatozoa. *Biochemistry* 1, 367-372.
- Tran, T.N., and Christophersen, B.O. (2002). Partitioning of polyunsaturated fatty acid oxidation between mitochondria and peroxisomes in isolated rat hepatocytes studied by HPLC separation of oxidation products. *Biochim Biophys Acta* 1583, 195-204.
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., and Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology* 34, 385-393.
- Vazquez, J.M., and Roldan, E.R. (1997a). Diacylglycerol species as messengers and substrates for phosphatidylcholine re-synthesis during Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 48, 95-105.
- Vazquez, J.M., and Roldan, E.R. (1997b). Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the de novo formation of phosphatidylcholine. *Mol Reprod Dev* 47, 105-112.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., and Kopf, G.S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19, 242-248.
- Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G.D., Valenzuela, J.P., Jorgez, C.J., Alvarez, J.G., and Kopf, G.S. (1999a). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* 274, 3235-3242.
- Visconti, P.E., and Kopf, G.S. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 1-6.
- Visconti, P.E., Ning, X., Fornes, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A., and Kopf, G.S. (1999b). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214, 429-443.
- Visconti, P.E., Stewart-Savage, J., Blasco, A., Battaglia, L., Miranda, P., Kopf, G.S., and Tezon, J.G. (1999c). Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* 61, 76-84.
- Vriese, S.R.D. and Christophe, A.B. (2003). Male fertility and lipid metabolism, AOCS Press, Illinois, chap. 1-15, pp. 1-249.
- Wang, H.Y., and Schulz, H. (1989). Beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids with conjugated double bonds. Mitochondrial metabolism of octa-2,4,6-trienoic acid. *Biochem J* 264, 47-52.
- Waterhouse, K.E., Hofmo, P.O., Tverdal, A., and Miller, R.R., Jr. (2006). Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* 131, 887-894.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61, 481-492.
- Watson, P.F., and Plummer, J.M. (1985). The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: Johnson A, Larsson K (eds), *Deep Freezing of Boar Semen Proceedings of the First International Congress on Deep Freezing of Boar Semen Uppsala, Sweden: L Swedish University of Agricultural Sciences*, 113-127.
- Weingartner, A., Drobot, B., Herrmann, A., Sanchez-Canete, M.P., Gamarro, F., Castanys, S., and Günther Pomorski, T. (2010). Disruption of the lipid-transporting LdMT-LdRos3 complex in *Leishmania donovani* affects membrane lipid asymmetry but not host cell invasion. *PLoS ONE*, vol 5, nr. 8.
- Weitze, K.F. (1990). Long-term storage of extended boar semen. *Reprod Dom Anim*, 231-253.
- Wilkinson, S.G. (1988). Gram-negative bacteria. In *Microbial lipids*. C Ratlidge and S G Wilkinson, editors, *Microbial lipids Vol 1 Academic Press, London, UK*, 299-488.
- Wu, Y.M., Xia, X.Y., Pan, L.J., Shao, Y., Jin, B.F., Huang, Y.F., and Wang, X.L. (2006). Evaluation of sperm mitochondrial function using Rh123/PI dual fluorescent staining. *Zhonghua Nan Ke Xue* 12, 803-806.
- Yalcyn, H., Unal, M.K., and Basmacyoolu, H. (2007). The fatty acid and cholesterol composition of enriched egg yolk lipids obtained by modifying hens' diets with fish oil and flaxseed. *Espagnol* 58, 7.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J.D. Neill, eds. Raven Press, New York, 189-317.
- Yoshida, M. (2000). Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci* 60-61.
- Zanetti, S.R., de Los Angeles Monclus, M., Rensetti, D.E., Fornes, M.W., and Avelano, M.I. (2010a). Ceramides with 2-hydroxylated, very long-chain polyenoic fatty acids in rodents: From testis to fertilization-competent spermatozoa. *Biochimie* 92, 1778-1786.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

Zanetti, S.R., Monclus Mde, L., Rensetti, D.E., Fornes, M.W., and Avelano, M.I. (2010b). Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. *Biochimie* 92, 1886-1894.

Zaneveld, L.J., De Jonge, C.J., Anderson, R.A., and Mack, S.R. (1991). Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 6, 1265-1274.

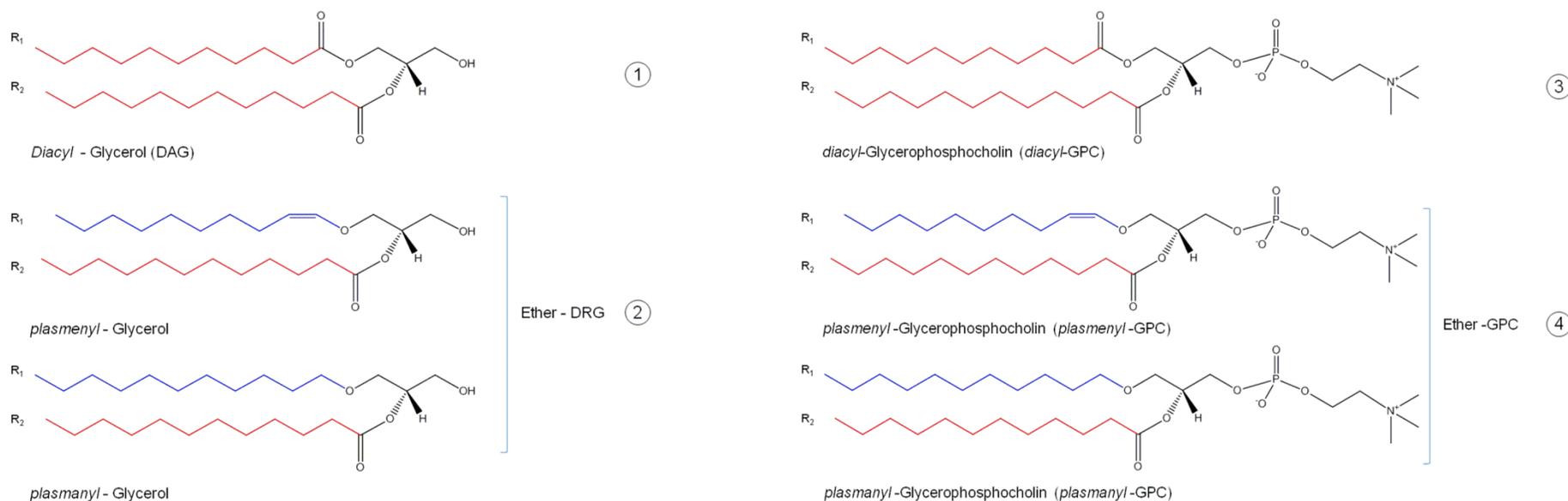
Zhang, Y.M., and Rock, C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6, 222-233.

## 8 ANHANG

### 8.1.1 Auszug aus der Datenbank, die Atommassen der Quasimolekülonen von GPC und DRG.

Kombinatorische Möglichkeiten des metabolischen Einbaus von [U-<sup>13</sup>C]-Octadecadiensäure (grau markiert) sowie die möglicherweise vorkommende Kombinationen von endogen vorhandenen Fettsäuren und Fettaldehyden in Lipiden porciner *Spermatozoen*.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind hier nur die Massen der Quasimolekülonen von GPC und DRG dargestellt. GPE / GPI / GPS, mono-GPE / GPI / GPS (lyso-GPL), Monoradylglycerole sowie deren Oxidationsprodukte werden hier nur exemplarisch dargestellt. Ebenfalls werden hier die kombinatorischen Möglichkeiten der MS / MS-Fragmentierung aller dieser Lipide nicht aufgelistet.



# ANHANG

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	① DAG [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	① DAG [M+Na] <sup>+</sup>	② Ether-DRG [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	② Ether-DRG [M+Na] <sup>+</sup>	③ GPC [M+H] <sup>+</sup>	③ GPC [M+Na] <sup>+</sup>	④ Ether-GPC [M+H] <sup>+</sup>	④ Ether-GPC [M+Na] <sup>+</sup>
12:0	12:0	474,4148	479,3707	460,4355	465,3914	622,4431	644,4256	608,4639	630,4464
	14:0	502,4461	507,4020	488,4668	493,4227	650,4744	672,4569	636,4952	658,4777
	16:0	530,4774	535,4333	516,4981	521,4540	678,5057	700,4882	664,5265	686,5090
	16:1	528,4617	533,4176	514,4824	519,4384	676,4901	698,4726	662,5108	684,4933
	18:0	558,5087	563,4646	544,5294	549,4853	706,5370	728,5195	692,5578	714,5403
	18:1	556,4930	561,4489	542,5137	547,4697	704,5214	726,5039	690,5421	712,5246
	18:2	554,4774	559,4333	540,4981	545,4540	702,5057	724,4882	688,5265	710,5090
	18:2- <sup>13</sup> C	572,5377	577,4937	558,5585	563,5144	720,5661	742,5486	706,5869	728,5693
	18:3	552,4617	557,4176	538,4824	543,4384	700,4901	722,4726	686,5108	708,4933
	20:0	586,5400	591,4959	572,5607	577,5166	734,5683	756,5508	720,5891	742,5716
	20:2	582,5087	587,4646	568,5294	573,4853	730,5370	752,5195	716,5578	738,5403
	20:4	578,4774	583,4333	564,4981	569,4540	726,5057	748,4882	712,5265	734,5090
	20:5	576,4617	581,4176	562,4824	567,4384	724,4901	746,4726	710,5108	732,4933
	22:0	614,5713	619,5272	600,5920	605,5479	762,5996	784,5821	748,6204	770,6029
	22:1	612,5556	617,5115	598,5763	603,5323	760,5840	782,5665	746,6047	768,5872
	22:4	606,5087	611,4646	592,5294	597,4853	754,5370	776,5195	740,5578	762,5403
	22:5	604,4930	609,4489	590,5137	595,4697	752,5214	774,5039	738,5421	760,5246
	22:6	602,4774	607,4333	588,4981	593,4540	750,5057	772,4882	736,5265	758,5090
	24:0	642,6026	647,5585	628,6233	633,5792	790,6309	812,6134	776,6517	798,6342
	24:1	640,5869	645,5428	626,6076	631,5636	788,6153	810,5978	774,6360	796,6185
	24:2	638,5713	643,5272	624,5920	629,5479	786,5996	808,5821	772,6204	794,6029
	24:4	634,5400	639,4959	620,5607	625,5166	782,5683	804,5508	768,5891	790,5716
	24:5	632,5243	637,4802	618,5450	623,5010	780,5527	802,5352	766,5734	788,5559
	24:6	630,5087	635,4646	616,5294	621,4853	778,5370	800,5195	764,5578	786,5403
	26:3	664,5869	669,5428	650,6076	655,5636	812,6153	834,5978	798,6360	820,6185
	26:4	662,5713	667,5272	648,5920	653,5479	810,5996	832,5821	796,6204	818,6029
	26:5	660,5556	665,5115	646,5763	651,5323	808,5840	830,5665	794,6047	816,5872
	28:4	690,6026	695,5585	676,6233	681,5792	838,6309	860,6134	824,6517	846,6342
	28:5	688,5869	693,5428	674,6076	679,5636	836,6153	858,5978	822,6360	844,6185
	28:6	686,5713	691,5272	672,5920	677,5479	834,5996	856,5821	820,6204	842,6029
	30:4	718,6339	723,5898	704,6546	709,6105	866,6622	888,6447	852,6830	874,6655
	30:5	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	30:6	714,6026	719,5585	700,6233	705,5792	862,6309	884,6134	848,6517	870,6342
	32:4	746,6652	751,6211	732,6859	737,6418	894,6935	916,6760	880,7143	902,6968
32:5	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811	
32:6	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655	
34:5	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124	
34:6	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968	
14:0	14:0	530,4774	535,4333	516,4981	521,4540	678,5057	700,4882	664,5265	686,5090
	16:0	558,5087	563,4646	544,5294	549,4853	706,5370	728,5195	692,5578	714,5403
	16:1	556,4930	561,4489	542,5137	547,4697	704,5214	726,5039	690,5421	712,5246
	18:0	586,5400	591,4959	572,5607	577,5166	734,5683	756,5508	720,5891	742,5716
	18:1	584,5243	589,4802	570,5450	575,5010	732,5527	754,5352	718,5734	740,5559

# ANHANG

	<b>18:2</b>	582,5087	587,4646	568,5294	573,4853	730,5370	752,5195	716,5578	738,5403
	<b>18:2:<sup>13</sup>C</b>	<b>600,5690</b>	<b>605,5250</b>	<b>586,5898</b>	<b>591,5457</b>	<b>748,5974</b>	<b>770,5799</b>	<b>734,6182</b>	<b>756,6006</b>
	<b>18:3</b>	580,4930	585,4489	566,5137	571,4697	728,5214	750,5039	714,5421	736,5246
	<b>20:0</b>	614,5713	619,5272	600,5920	605,5479	762,5996	784,5821	748,6204	770,6029
	<b>20:2</b>	610,5400	615,4959	596,5607	601,5166	758,5683	780,5508	744,5891	766,5716
	<b>20:4</b>	606,5087	611,4646	592,5294	597,4853	754,5370	776,5195	740,5578	762,5403
	<b>20:5</b>	604,4930	609,4489	590,5137	595,4697	752,5214	774,5039	738,5421	760,5246
	<b>22:0</b>	642,6026	647,5585	628,6233	633,5792	790,6309	812,6134	776,6517	798,6342
	<b>22:1</b>	640,5869	645,5428	626,6076	631,5636	788,6153	810,5978	774,6360	796,6185
	<b>22:4</b>	634,5400	639,4959	620,5607	625,5166	782,5683	804,5508	768,5891	790,5716
	<b>22:5</b>	632,5243	637,4802	618,5450	623,5010	780,5527	802,5352	766,5734	788,5559
	<b>22:6</b>	630,5087	635,4646	616,5294	621,4853	778,5370	800,5195	764,5578	786,5403
	<b>24:0</b>	670,6339	675,5898	656,6546	661,6105	818,6622	840,6447	804,6830	826,6655
	<b>24:1</b>	668,6182	673,5741	654,6389	659,5949	816,6466	838,6291	802,6673	824,6498
	<b>24:2</b>	666,6026	671,5585	652,6233	657,5792	814,6309	836,6134	800,6517	822,6342
	<b>24:4</b>	662,5713	667,5272	648,5920	653,5479	810,5996	832,5821	796,6204	818,6029
	<b>24:5</b>	660,5556	665,5115	646,5763	651,5323	808,5840	830,5665	794,6047	816,5872
	<b>24:6</b>	658,5400	663,4959	644,5607	649,5166	806,5683	828,5508	792,5891	814,5716
	<b>26:3</b>	692,6182	697,5741	678,6389	683,5949	840,6466	862,6291	826,6673	848,6498
	<b>26:4</b>	690,6026	695,5585	676,6233	681,5792	838,6309	860,6134	824,6517	846,6342
	<b>26:5</b>	688,5869	693,5428	674,6076	679,5636	836,6153	858,5978	822,6360	844,6185
	<b>28:4</b>	718,6339	723,5898	704,6546	709,6105	866,6622	888,6447	852,6830	874,6655
	<b>28:5</b>	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	<b>28:6</b>	714,6026	719,5585	700,6233	705,5792	862,6309	884,6134	848,6517	870,6342
	<b>30:4</b>	746,6652	751,6211	732,6859	737,6418	894,6935	916,6760	880,7143	902,6968
	<b>30:5</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>30:6</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>32:4</b>	774,6965	779,6524	760,7172	765,6731	922,7248	944,7073	908,7456	930,7281
	<b>32:5</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124
	<b>32:6</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>34:5</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>34:6</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
<b>16:0</b>	<b>16:0</b>	586,5400	591,4959	572,5607	577,5166	734,5683	756,5508	720,5891	742,5716
	<b>16:1</b>	584,5243	589,4802	570,5450	575,5010	732,5527	754,5352	718,5734	740,5559
	<b>18:0</b>	614,5713	619,5272	600,5920	605,5479	762,5996	784,5821	748,6204	770,6029
	<b>18:1</b>	612,5556	617,5115	598,5763	603,5323	760,5840	782,5665	746,6047	768,5872
	<b>18:2</b>	610,5400	615,4959	596,5607	601,5166	758,5683	780,5508	744,5891	766,5716
	<b>18:2:<sup>13</sup>C</b>	<b>628,6003</b>	<b>633,5563</b>	<b>614,6211</b>	<b>619,5770</b>	<b>776,6287</b>	<b>798,6112</b>	<b>762,6495</b>	<b>784,6319</b>
	<b>18:3</b>	608,5243	613,4802	594,5450	599,5010	756,5527	778,5352	742,5734	764,5559
	<b>20:0</b>	642,6026	647,5585	628,6233	633,5792	790,6309	812,6134	776,6517	798,6342
	<b>20:2</b>	638,5713	643,5272	624,5920	629,5479	786,5996	808,5821	772,6204	794,6029
	<b>20:4</b>	634,5400	639,4959	620,5607	625,5166	782,5683	804,5508	768,5891	790,5716
	<b>20:5</b>	632,5243	637,4802	618,5450	623,5010	780,5527	802,5352	766,5734	788,5559
	<b>22:0</b>	670,6339	675,5898	656,6546	661,6105	818,6622	840,6447	804,6830	826,6655
	<b>22:1</b>	668,6182	673,5741	654,6389	659,5949	816,6466	838,6291	802,6673	824,6498
	<b>22:4</b>	662,5713	667,5272	648,5920	653,5479	810,5996	832,5821	796,6204	818,6029
	<b>22:5</b>	660,5556	665,5115	646,5763	651,5323	808,5840	830,5665	794,6047	816,5872
	<b>22:6</b>	658,5400	663,4959	644,5607	649,5166	806,5683	828,5508	792,5891	814,5716

# ANHANG

	<b>24:0</b>	698,6652	703,6211	684,6859	689,6418	846,6935	868,6760	832,7143	854,6968
	<b>24:1</b>	696,6495	701,6054	682,6702	687,6262	844,6779	866,6604	830,6986	852,6811
	<b>24:2</b>	694,6339	699,5898	680,6546	685,6105	842,6622	864,6447	828,6830	850,6655
	<b>24:4</b>	690,6026	695,5585	676,6233	681,5792	838,6309	860,6134	824,6517	846,6342
	<b>24:5</b>	688,5869	693,5428	674,6076	679,5636	836,6153	858,5978	822,6360	844,6185
	<b>24:6</b>	686,5713	691,5272	672,5920	677,5479	834,5996	856,5821	820,6204	842,6029
	<b>26:3</b>	720,6495	725,6054	706,6702	711,6262	868,6779	890,6604	854,6986	876,6811
	<b>26:4</b>	718,6339	723,5898	704,6546	709,6105	866,6622	888,6447	852,6830	874,6655
	<b>26:5</b>	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	<b>28:4</b>	746,6652	751,6211	732,6859	737,6418	894,6935	916,6760	880,7143	902,6968
	<b>28:5</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>28:6</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>30:4</b>	774,6965	779,6524	760,7172	765,6731	922,7248	944,7073	908,7456	930,7281
	<b>30:5</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124
	<b>30:6</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>32:4</b>	802,7278	807,6837	788,7485	793,7044	950,7561	972,7386	936,7769	958,7594
	<b>32:5</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>32:6</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>34:5</b>	828,7434	833,6993	814,7641	819,7201	976,7718	998,7543	962,7925	984,7750
	<b>34:6</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
<b>16:1</b>	<b>16:1</b>	582,5087	587,4646	568,5294	573,4853	730,5370	752,5195	716,5578	738,5403
	<b>18:0</b>	612,5556	617,5115	598,5763	603,5323	760,5840	782,5665	746,6047	768,5872
	<b>18:1</b>	610,5400	615,4959	596,5607	601,5166	758,5683	780,5508	744,5891	766,5716
	<b>18:2</b>	608,5243	613,4802	594,5450	599,5010	756,5527	778,5352	742,5734	764,5559
	<b>18:2:<sup>13</sup>C</b>	<b>626,5847</b>	<b>631,5406</b>	<b>612,6054</b>	<b>617,5614</b>	<b>774,6131</b>	<b>796,5956</b>	<b>760,6338</b>	<b>782,6163</b>
	<b>18:3</b>	606,5087	611,4646	592,5294	597,4853	754,5370	776,5195	740,5578	762,5403
	<b>20:0</b>	640,5869	645,5428	626,6076	631,5636	788,6153	810,5978	774,6360	796,6185
	<b>20:2</b>	636,5556	641,5115	622,5763	627,5323	784,5840	806,5665	770,6047	792,5872
	<b>20:4</b>	632,5243	637,4802	618,5450	623,5010	780,5527	802,5352	766,5734	788,5559
	<b>20:5</b>	630,5087	635,4646	616,5294	621,4853	778,5370	800,5195	764,5578	786,5403
	<b>22:0</b>	668,6182	673,5741	654,6389	659,5949	816,6466	838,6291	802,6673	824,6498
	<b>22:1</b>	666,6026	671,5585	652,6233	657,5792	814,6309	836,6134	800,6517	822,6342
	<b>22:4</b>	660,5556	665,5115	646,5763	651,5323	808,5840	830,5665	794,6047	816,5872
	<b>22:5</b>	658,5400	663,4959	644,5607	649,5166	806,5683	828,5508	792,5891	814,5716
	<b>22:6</b>	656,5243	661,4802	642,5450	647,5010	804,5527	826,5352	790,5734	812,5559
	<b>24:0</b>	696,6495	701,6054	682,6702	687,6262	844,6779	866,6604	830,6986	852,6811
	<b>24:1</b>	694,6339	699,5898	680,6546	685,6105	842,6622	864,6447	828,6830	850,6655
	<b>24:2</b>	692,6182	697,5741	678,6389	683,5949	840,6466	862,6291	826,6673	848,6498
	<b>24:4</b>	688,5869	693,5428	674,6076	679,5636	836,6153	858,5978	822,6360	844,6185
	<b>24:5</b>	686,5713	691,5272	672,5920	677,5479	834,5996	856,5821	820,6204	842,6029
	<b>24:6</b>	684,5556	689,5115	670,5763	675,5323	832,5840	854,5665	818,6047	840,5872
	<b>26:3</b>	718,6339	723,5898	704,6546	709,6105	866,6622	888,6447	852,6830	874,6655
	<b>26:4</b>	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	<b>26:5</b>	714,6026	719,5585	700,6233	705,5792	862,6309	884,6134	848,6517	870,6342
	<b>28:4</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>28:5</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>28:6</b>	740,6182	745,5741	726,6389	731,5949	888,6466	910,6291	874,6673	896,6498
	<b>30:4</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124

# ANHANG

	<b>30:5</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>30:6</b>	768,6495	773,6054	754,6702	759,6262	916,6779	938,6604	902,6986	924,6811
	<b>32:4</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>32:5</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>32:6</b>	796,6808	801,6367	782,7015	787,6575	944,7092	966,6917	930,7299	952,7124
	<b>34:5</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
	<b>34:6</b>	824,7121	829,6680	810,7328	815,6888	972,7405	994,7230	958,7612	980,7437
<b>18:0</b>	<b>18:0</b>	642,6026	647,5585	628,6233	633,5792	790,6309	812,6134	776,6517	798,6342
	<b>18:1</b>	640,5869	645,5428	626,6076	631,5636	788,6153	810,5978	774,6360	796,6185
	<b>18:2</b>	638,5713	643,5272	624,5920	629,5479	786,5996	808,5821	772,6204	794,6029
	<b>18:2-<sup>13</sup>C</b>	<b>656,6316</b>	<b>661,5876</b>	<b>642,6524</b>	<b>647,6083</b>	<b>804,6600</b>	<b>826,6425</b>	<b>790,6808</b>	<b>812,6632</b>
	<b>18:3</b>	636,5556	641,5115	622,5763	627,5323	784,5840	806,5665	770,6047	792,5872
	<b>20:0</b>	670,6339	675,5898	656,6546	661,6105	818,6622	840,6447	804,6830	826,6655
	<b>20:2</b>	666,6026	671,5585	652,6233	657,5792	814,6309	836,6134	800,6517	822,6342
	<b>20:4</b>	662,5713	667,5272	648,5920	653,5479	810,5996	832,5821	796,6204	818,6029
	<b>20:5</b>	660,5556	665,5115	646,5763	651,5323	808,5840	830,5665	794,6047	816,5872
	<b>22:0</b>	698,6652	703,6211	684,6859	689,6418	846,6935	868,6760	832,7143	854,6968
	<b>22:1</b>	696,6495	701,6054	682,6702	687,6262	844,6779	866,6604	830,6986	852,6811
	<b>22:4</b>	690,6026	695,5585	676,6233	681,5792	838,6309	860,6134	824,6517	846,6342
	<b>22:5</b>	688,5869	693,5428	674,6076	679,5636	836,6153	858,5978	822,6360	844,6185
	<b>22:6</b>	686,5713	691,5272	672,5920	677,5479	834,5996	856,5821	820,6204	842,6029
	<b>24:0</b>	726,6965	731,6524	712,7172	717,6731	874,7248	896,7073	860,7456	882,7281
	<b>24:1</b>	724,6808	729,6367	710,7015	715,6575	872,7092	894,6917	858,7299	880,7124
	<b>24:2</b>	722,6652	727,6211	708,6859	713,6418	870,6935	892,6760	856,7143	878,6968
	<b>24:4</b>	718,6339	723,5898	704,6546	709,6105	866,6622	888,6447	852,6830	874,6655
	<b>24:5</b>	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	<b>24:6</b>	714,6026	719,5585	700,6233	705,5792	862,6309	884,6134	848,6517	870,6342
	<b>26:3</b>	748,6808	753,6367	734,7015	739,6575	896,7092	916,6760	882,7299	904,7124
	<b>26:4</b>	746,6652	751,6211	732,6859	737,6418	894,6935	914,6604	880,7143	902,6968
	<b>26:5</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	912,6447	878,6986	900,6811
	<b>28:4</b>	774,6965	779,6524	760,7172	765,6731	922,7248	944,7073	908,7456	930,7281
	<b>28:5</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124
	<b>28:6</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>30:4</b>	802,7278	807,6837	788,7485	793,7044	950,7561	972,7386	936,7769	958,7594
	<b>30:5</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>30:6</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>32:4</b>	830,7591	835,7150	816,7798	821,7357	978,7874	1000,7699	964,8082	986,7907
	<b>32:5</b>	828,7434	833,6993	814,7641	819,7201	976,7718	998,7543	962,7925	984,7750
	<b>32:6</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
<b>34:5</b>	856,7747	861,7306	842,7954	847,7514	1004,8031	1026,7856	990,8238	1012,8063	
<b>34:6</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907	
<b>18:1</b>	<b>18:1</b>	638,5713	643,5272	624,5920	629,5479	786,5996	808,5821	772,6204	794,6029
	<b>18:2</b>	636,5556	641,5115	622,5763	627,5323	784,5840	806,5665	770,6047	792,5872
	<b>18:2-<sup>13</sup>C</b>	<b>654,6160</b>	<b>659,5719</b>	<b>640,6367</b>	<b>645,5927</b>	<b>802,6444</b>	<b>824,6269</b>	<b>788,6651</b>	<b>810,6476</b>
	<b>18:3</b>	634,5400	639,4959	620,5607	625,5166	782,5683	804,5508	768,5891	790,5716
	<b>20:0</b>	668,6182	673,5741	654,6389	659,5949	816,6466	838,6291	802,6673	824,6498
	<b>20:2</b>	664,5869	669,5428	650,6076	655,5636	812,6153	834,5978	798,6360	820,6185

# ANHANG

	<b>20:4</b>	660,5556	665,5115	646,5763	651,5323	808,5840	830,5665	794,6047	816,5872
	<b>20:5</b>	658,5400	663,4959	644,5607	649,5166	806,5683	828,5508	792,5891	814,5716
	<b>22:0</b>	696,6495	701,6054	682,6702	687,6262	844,6779	866,6604	830,6986	852,6811
	<b>22:1</b>	694,6339	699,5898	680,6546	685,6105	842,6622	864,6447	828,6830	850,6655
	<b>22:4</b>	688,5869	693,5428	674,6076	679,5636	836,6153	858,5978	822,6360	844,6185
	<b>22:5</b>	686,5713	691,5272	672,5920	677,5479	834,5996	856,5821	820,6204	842,6029
	<b>22:6</b>	684,5556	689,5115	670,5763	675,5323	832,5840	854,5665	818,6047	840,5872
	<b>24:0</b>	724,6808	729,6367	710,7015	715,6575	872,7092	894,6917	858,7299	880,7124
	<b>24:1</b>	722,6652	727,6211	708,6859	713,6418	870,6935	892,6760	856,7143	878,6968
	<b>24:2</b>	720,6495	725,6054	706,6702	711,6262	868,6779	890,6604	854,6986	876,6811
	<b>24:4</b>	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	<b>24:5</b>	714,6026	719,5585	700,6233	705,5792	862,6309	884,6134	848,6517	870,6342
	<b>24:6</b>	712,5869	717,5428	698,6076	703,5636	860,6153	882,5978	846,6360	868,6185
	<b>26:3</b>	746,6652	751,6211	732,6859	737,6418	894,6935	916,6760	880,7143	902,6968
	<b>26:4</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>26:5</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>28:4</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124
	<b>28:5</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>28:6</b>	768,6495	773,6054	754,6702	759,6262	916,6779	938,6604	902,6986	924,6811
	<b>30:4</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>30:5</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>30:6</b>	796,6808	801,6367	782,7015	787,6575	944,7092	966,6917	930,7299	952,7124
	<b>32:4</b>	828,7434	833,6993	814,7641	819,7201	976,7718	998,7543	962,7925	984,7750
	<b>32:5</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
	<b>32:6</b>	824,7121	829,6680	810,7328	815,6888	972,7405	994,7230	958,7612	980,7437
	<b>34:5</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907
	<b>34:6</b>	852,7434	857,6993	838,7641	843,7201	1000,7718	1022,7543	986,7925	1008,7750
<b>18:2</b>	<b>18:2</b>	634,5400	639,4959	620,5607	625,5166	782,5683	804,5508	768,5891	790,5716
	<b>18:2:<sup>13</sup>C</b>	<b>652,6003</b>	<b>657,5563</b>	<b>638,6211</b>	<b>643,5770</b>	<b>800,6287</b>	<b>822,6112</b>	<b>786,6495</b>	<b>808,6319</b>
	<b>18:3</b>	632,5243	637,4802	618,5450	623,5010	780,5527	802,5352	766,5734	788,5559
	<b>20:0</b>	666,6026	671,5585	652,6233	657,5792	814,6309	836,6134	800,6517	822,6342
	<b>20:2</b>	662,5713	667,5272	648,5920	653,5479	810,5996	832,5821	796,6204	818,6029
	<b>20:4</b>	658,5400	663,4959	644,5607	649,5166	806,5683	828,5508	792,5891	814,5716
	<b>20:5</b>	656,5243	661,4802	642,5450	647,5010	804,5527	826,5352	790,5734	812,5559
	<b>22:0</b>	694,6339	699,5898	680,6546	685,6105	842,6622	864,6447	828,6830	850,6655
	<b>22:1</b>	692,6182	697,5741	678,6389	683,5949	840,6466	862,6291	826,6673	848,6498
	<b>22:4</b>	686,5713	691,5272	672,5920	677,5479	834,5996	856,5821	820,6204	842,6029
	<b>22:5</b>	684,5556	689,5115	670,5763	675,5323	832,5840	854,5665	818,6047	840,5872
	<b>22:6</b>	682,5400	687,4959	668,5607	673,5166	830,5683	852,5508	816,5891	838,5716
	<b>24:0</b>	722,6652	727,6211	708,6859	713,6418	870,6935	892,6760	856,7143	878,6968
	<b>24:1</b>	720,6495	725,6054	706,6702	711,6262	868,6779	890,6604	854,6986	876,6811
	<b>24:2</b>	718,6339	723,5898	704,6546	709,6105	866,6622	888,6447	852,6830	874,6655
	<b>24:4</b>	714,6026	719,5585	700,6233	705,5792	862,6309	884,6134	848,6517	870,6342
	<b>24:5</b>	712,5869	717,5428	698,6076	703,5636	860,6153	882,5978	846,6360	868,6185
	<b>24:6</b>	710,5713	715,5272	696,5920	701,5479	858,5996	880,5821	844,6204	866,6029
	<b>26:3</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>26:4</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>26:5</b>	740,6182	745,5741	726,6389	731,5949	888,6466	910,6291	874,6673	896,6498

# ANHANG

	<b>28:4</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>28:5</b>	768,6495	773,6054	754,6702	759,6262	916,6779	938,6604	902,6986	924,6811
	<b>28:6</b>	766,6339	771,5898	752,6546	757,6105	914,6622	936,6447	900,6830	922,6655
	<b>30:4</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>30:5</b>	796,6808	801,6367	782,7015	787,6575	944,7092	966,6917	930,7299	952,7124
	<b>30:6</b>	794,6652	799,6211	780,6859	785,6418	942,6935	964,6760	928,7143	950,6968
	<b>32:4</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
	<b>32:5</b>	824,7121	829,6680	810,7328	815,6888	972,7405	994,7230	958,7612	980,7437
	<b>32:6</b>	822,6965	827,6524	808,7172	813,6731	970,7248	992,7073	956,7456	978,7281
	<b>34:5</b>	852,7434	857,6993	838,7641	843,7201	1000,7718	1022,7543	986,7925	1008,7750
	<b>34:6</b>	850,7278	855,6837	836,7485	841,7044	998,7561	1020,7386	984,7769	1006,7594
<b>18:2:<sup>13</sup>C</b>	<b>18:2:<sup>13</sup>C</b>	670,6607	675,6167	656,6815	661,6374	818,6891	840,6716	804,7098	826,6923
	<b>18:3</b>	650,5847	655,5406	636,6054	641,5614	798,6131	820,5956	784,6338	806,6163
	<b>20:0</b>	684,6629	689,6189	670,6837	675,6396	832,6913	854,6738	818,7121	840,6946
	<b>20:2</b>	680,6316	685,5876	666,6524	671,6083	828,6600	850,6425	814,6808	836,6632
	<b>20:4</b>	676,6003	681,5563	662,6211	667,5770	824,6287	846,6112	810,6495	832,6319
	<b>20:5</b>	674,5847	679,5406	660,6054	665,5614	822,6131	844,5956	808,6338	830,6163
	<b>22:0</b>	712,6942	717,6502	698,7150	703,6709	860,7226	882,7051	846,7434	868,7259
	<b>22:1</b>	710,6786	715,6345	696,6993	701,6553	858,7070	880,6895	844,7277	866,7102
	<b>22:4</b>	704,6316	709,5876	690,6524	695,6083	852,6600	874,6425	838,6808	860,6632
	<b>22:5</b>	702,6160	707,5719	688,6367	693,5927	850,6444	872,6269	836,6651	858,6476
	<b>22:6</b>	700,6003	705,5563	686,6211	691,5770	848,6287	870,6112	834,6495	856,6319
	<b>24:0</b>	740,7255	745,6815	726,7463	731,7022	888,7539	910,7364	874,7747	896,7572
	<b>24:1</b>	738,7099	743,6658	724,7306	729,6866	886,7383	908,7208	872,7590	894,7415
	<b>24:2</b>	736,6942	741,6502	722,7150	727,6709	884,7226	906,7051	870,7434	892,7259
	<b>24:4</b>	732,6629	737,6189	718,6837	723,6396	880,6913	902,6738	866,7121	888,6946
	<b>24:5</b>	730,6473	735,6032	716,6680	721,6240	878,6757	900,6582	864,6964	886,6789
	<b>24:6</b>	728,6316	733,5876	714,6524	719,6083	876,6600	898,6425	862,6808	884,6632
	<b>26:3</b>	762,7099	767,6658	748,7306	753,6866	910,7383	932,7208	896,7590	918,7415
	<b>26:4</b>	760,6942	765,6502	746,7150	751,6709	908,7226	930,7051	894,7434	916,7259
	<b>26:5</b>	758,6786	763,6345	744,6993	749,6553	906,7070	928,6895	892,7277	914,7102
	<b>28:4</b>	788,7255	793,6815	774,7463	779,7022	936,7539	958,7364	922,7747	944,7572
	<b>28:5</b>	786,7099	791,6658	772,7306	777,6866	934,7383	956,7208	920,7590	942,7415
	<b>28:6</b>	784,6942	789,6502	770,7150	775,6709	932,7226	954,7051	918,7434	940,7259
	<b>30:4</b>	816,7568	821,7128	802,7776	807,7335	964,7852	986,7677	950,8060	972,7885
	<b>30:5</b>	814,7412	819,6971	800,7619	805,7179	962,7696	984,7521	948,7903	970,7728
	<b>30:6</b>	812,7255	817,6815	798,7463	803,7022	960,7539	982,7364	946,7747	968,7572
	<b>32:4</b>	844,7881	849,7441	830,8089	835,7648	992,8165	1014,7990	978,8373	1000,8198
	<b>32:5</b>	842,7725	847,7284	828,7932	833,7492	990,8009	1012,7834	976,8216	998,8041
	<b>32:6</b>	840,7568	845,7128	826,7776	831,7335	988,7852	1010,7677	974,8060	996,7885
	<b>34:5</b>	870,8038	875,7597	856,8245	861,7805	1018,8322	1040,8147	1004,8529	1026,8354
	<b>34:6</b>	868,7881	873,7441	854,8089	859,7648	1016,8165	1038,7990	1002,8373	1024,8198
<b>18:3</b>	<b>18:3</b>	630,5087	635,4646	616,5294	621,4853	778,5370	800,5195	764,5578	786,5403
	<b>20:0</b>	664,5869	669,5428	650,6076	655,5636	812,6153	834,5978	798,6360	820,6185
	<b>20:2</b>	660,5556	665,5115	646,5763	651,5323	808,5840	830,5665	794,6047	816,5872
	<b>20:4</b>	656,5243	661,4802	642,5450	647,5010	804,5527	826,5352	790,5734	812,5559
	<b>20:5</b>	654,5087	659,4646	640,5294	645,4853	802,5370	824,5195	788,5578	810,5403

## ANHANG

	<b>22:0</b>	692,6182	697,5741	678,6389	683,5949	840,6466	862,6291	826,6673	848,6498
	<b>22:1</b>	690,6026	695,5585	676,6233	681,5792	838,6309	860,6134	824,6517	846,6342
	<b>22:4</b>	684,5556	689,5115	670,5763	675,5323	832,5840	854,5665	818,6047	840,5872
	<b>22:5</b>	682,5400	687,4959	668,5607	673,5166	830,5683	852,5508	816,5891	838,5716
	<b>22:6</b>	680,5243	685,4802	666,5450	671,5010	828,5527	850,5352	814,5734	836,5559
	<b>24:0</b>	720,6495	725,6054	706,6702	711,6262	868,6779	890,6604	854,6986	876,6811
	<b>24:1</b>	718,6339	723,5898	704,6546	709,6105	866,6622	888,6447	852,6830	874,6655
	<b>24:2</b>	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	<b>24:4</b>	712,5869	717,5428	698,6076	703,5636	860,6153	882,5978	846,6360	868,6185
	<b>24:5</b>	710,5713	715,5272	696,5920	701,5479	858,5996	880,5821	844,6204	866,6029
	<b>24:6</b>	708,5556	713,5115	694,5763	699,5323	856,5840	878,5665	842,6047	864,5872
	<b>26:3</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>26:4</b>	740,6182	745,5741	726,6389	731,5949	888,6466	910,6291	874,6673	896,6498
	<b>26:5</b>	738,6026	743,5585	724,6233	729,5792	886,6309	908,6134	872,6517	894,6342
	<b>28:4</b>	768,6495	773,6054	754,6702	759,6262	916,6779	938,6604	902,6986	924,6811
	<b>28:5</b>	766,6339	771,5898	752,6546	757,6105	914,6622	936,6447	900,6830	922,6655
	<b>28:6</b>	764,6182	769,5741	750,6389	755,5949	912,6466	934,6291	898,6673	920,6498
	<b>30:4</b>	796,6808	801,6367	782,7015	787,6575	944,7092	966,6917	930,7299	952,7124
	<b>30:5</b>	794,6652	799,6211	780,6859	785,6418	942,6935	964,6760	928,7143	950,6968
	<b>30:6</b>	792,6495	797,6054	778,6702	783,6262	940,6779	962,6604	926,6986	948,6811
	<b>32:4</b>	824,7121	829,6680	810,7328	815,6888	972,7405	994,7230	958,7612	980,7437
	<b>32:5</b>	822,6965	827,6524	808,7172	813,6731	970,7248	992,7073	956,7456	978,7281
	<b>32:6</b>	820,6808	825,6367	806,7015	811,6575	968,7092	990,6917	954,7299	976,7124
	<b>34:5</b>	850,7278	855,6837	836,7485	841,7044	998,7561	1020,7386	984,7769	1006,7594
	<b>34:6</b>	848,7121	853,6680	834,7328	839,6888	996,7405	1018,7230	982,7612	1004,7437
<b>20:0</b>	<b>20:0</b>	698,6652	703,6211	684,6859	689,6418	846,6935	868,6760	832,7143	854,6968
	<b>20:2</b>	694,6339	699,5898	680,6546	685,6105	842,6622	864,6447	828,6830	850,6655
	<b>20:4</b>	690,6026	695,5585	676,6233	681,5792	838,6309	860,6134	824,6517	846,6342
	<b>20:5</b>	688,5869	693,5428	674,6076	679,5636	836,6153	858,5978	822,6360	844,6185
	<b>22:0</b>	726,6965	731,6524	712,7172	717,6731	874,7248	896,7073	860,7456	882,7281
	<b>22:1</b>	724,6808	729,6367	710,7015	715,6575	872,7092	894,6917	858,7299	880,7124
	<b>22:4</b>	718,6339	723,5898	704,6546	709,6105	866,6622	888,6447	852,6830	874,6655
	<b>22:5</b>	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	<b>22:6</b>	714,6026	719,5585	700,6233	705,5792	862,6309	884,6134	848,6517	870,6342
	<b>24:0</b>	754,7278	759,6837	740,7485	745,7044	902,7561	924,7386	888,7769	910,7594
	<b>24:1</b>	752,7121	757,6680	738,7328	743,6888	900,7405	922,7230	886,7612	908,7437
	<b>24:2</b>	750,6965	755,6524	736,7172	741,6731	898,7248	920,7073	884,7456	906,7281
	<b>24:4</b>	746,6652	751,6211	732,6859	737,6418	894,6935	916,6760	880,7143	902,6968
	<b>24:5</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>24:6</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>26:3</b>	776,7121	781,6680	762,7328	767,6888	924,7405	946,7230	910,7612	932,7437
	<b>26:4</b>	774,6965	779,6524	760,7172	765,6731	922,7248	944,7073	908,7456	930,7281
	<b>26:5</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124
	<b>28:4</b>	802,7278	807,6837	788,7485	793,7044	950,7561	972,7386	936,7769	958,7594
	<b>28:5</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>28:6</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>30:4</b>	830,7591	835,7150	816,7798	821,7357	978,7874	1000,7699	964,8082	986,7907
	<b>30:5</b>	828,7434	833,6993	814,7641	819,7201	976,7718	998,7543	962,7925	984,7750

## ANHANG

	<b>30:6</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
	<b>32:4</b>	858,7904	863,7463	844,8111	849,7670	1006,8187	1028,8012	992,8395	1014,8220
	<b>32:5</b>	856,7747	861,7306	842,7954	847,7514	1004,8031	1026,7856	990,8238	1012,8063
	<b>32:6</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907
	<b>34:5</b>	884,8060	889,7619	870,8267	875,7827	1032,8344	1054,8169	1018,8551	1040,8376
	<b>34:6</b>	882,7904	887,7463	868,8111	873,7670	1030,8187	1052,8012	1016,8395	1038,8220
<b>20:2</b>	<b>20:2</b>	690,6026	695,5585	676,6233	681,5792	838,6309	860,6134	824,6517	846,6342
	<b>20:4</b>	686,5713	691,5272	672,5920	677,5479	834,5996	856,5821	820,6204	842,6029
	<b>20:5</b>	684,5556	689,5115	670,5763	675,5323	832,5840	854,5665	818,6047	840,5872
	<b>22:0</b>	722,6652	727,6211	708,6859	713,6418	870,6935	892,6760	856,7143	878,6968
	<b>22:1</b>	720,6495	725,6054	706,6702	711,6262	868,6779	890,6604	854,6986	876,6811
	<b>22:4</b>	714,6026	719,5585	700,6233	705,5792	862,6309	884,6134	848,6517	870,6342
	<b>22:5</b>	712,5869	717,5428	698,6076	703,5636	860,6153	882,5978	846,6360	868,6185
	<b>22:6</b>	710,5713	715,5272	696,5920	701,5479	858,5996	880,5821	844,6204	866,6029
	<b>24:0</b>	750,6965	755,6524	736,7172	741,6731	898,7248	920,7073	884,7456	906,7281
	<b>24:1</b>	748,6808	753,6367	734,7015	739,6575	896,7092	918,6917	882,7299	904,7124
	<b>24:2</b>	746,6652	751,6211	732,6859	737,6418	894,6935	916,6760	880,7143	902,6968
	<b>24:4</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>24:5</b>	740,6182	745,5741	726,6389	731,5949	888,6466	910,6291	874,6673	896,6498
	<b>24:6</b>	738,6026	743,5585	724,6233	729,5792	886,6309	908,6134	872,6517	894,6342
	<b>26:3</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124
	<b>26:4</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>26:5</b>	768,6495	773,6054	754,6702	759,6262	916,6779	938,6604	902,6986	924,6811
	<b>28:4</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>28:5</b>	796,6808	801,6367	782,7015	787,6575	944,7092	966,6917	930,7299	952,7124
	<b>28:6</b>	794,6652	799,6211	780,6859	785,6418	942,6935	964,6760	928,7143	950,6968
	<b>30:4</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
	<b>30:5</b>	824,7121	829,6680	810,7328	815,6888	972,7405	994,7230	958,7612	980,7437
	<b>30:6</b>	822,6965	827,6524	808,7172	813,6731	970,7248	992,7073	956,7456	978,7281
	<b>32:4</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907
	<b>32:5</b>	852,7434	857,6993	838,7641	843,7201	1000,7718	1022,7543	986,7925	1008,7750
	<b>32:6</b>	850,7278	855,6837	836,7485	841,7044	998,7561	1020,7386	984,7769	1006,7594
	<b>34:5</b>	880,7747	885,7306	866,7954	871,7514	1028,8031	1050,7856	1014,8238	1036,8063
	<b>34:6</b>	878,7591	883,7150	864,7798	869,7357	1026,7874	1048,7699	1012,8082	1034,7907
<b>20:4</b>	<b>20:4</b>	682,5400	687,4959	668,5607	673,5166	830,5683	852,5508	816,5891	838,5716
	<b>20:5</b>	680,5243	685,4802	666,5450	671,5010	828,5527	850,5352	814,5734	836,5559
	<b>22:0</b>	718,6339	723,5898	704,6546	709,6105	866,6622	888,6447	852,6830	874,6655
	<b>22:1</b>	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	<b>22:4</b>	710,5713	715,5272	696,5920	701,5479	858,5996	880,5821	844,6204	866,6029
	<b>22:5</b>	708,5556	713,5115	694,5763	699,5323	856,5840	878,5665	842,6047	864,5872
	<b>22:6</b>	706,5400	711,4959	692,5607	697,5166	854,5683	876,5508	840,5891	862,5716
	<b>24:0</b>	746,6652	751,6211	732,6859	737,6418	894,6935	916,6760	880,7143	902,6968
	<b>24:1</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>24:2</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>24:4</b>	738,6026	743,5585	724,6233	729,5792	886,6309	908,6134	872,6517	894,6342
	<b>24:5</b>	736,5869	741,5428	722,6076	727,5636	884,6153	906,5978	870,6360	892,6185
	<b>24:6</b>	734,5713	739,5272	720,5920	725,5479	882,5996	904,5821	868,6204	890,6029

# ANHANG

	<b>26:3</b>	768,6495	773,6054	754,6702	759,6262	916,6779	938,6604	902,6986	924,6811
	<b>26:4</b>	766,6339	771,5898	752,6546	757,6105	914,6622	936,6447	900,6830	922,6655
	<b>26:5</b>	764,6182	769,5741	750,6389	755,5949	912,6466	934,6291	898,6673	920,6498
	<b>28:4</b>	794,6652	799,6211	780,6859	785,6418	942,6935	964,6760	928,7143	950,6968
	<b>28:5</b>	792,6495	797,6054	778,6702	783,6262	940,6779	962,6604	926,6986	948,6811
	<b>28:6</b>	790,6339	795,5898	776,6546	781,6105	938,6622	960,6447	924,6830	946,6655
	<b>30:4</b>	822,6965	827,6524	808,7172	813,6731	970,7248	992,7073	956,7456	978,7281
	<b>30:5</b>	820,6808	825,6367	806,7015	811,6575	968,7092	990,6917	954,7299	976,7124
	<b>30:6</b>	818,6652	823,6211	804,6859	809,6418	966,6935	988,6760	952,7143	974,6968
	<b>32:4</b>	850,7278	855,6837	836,7485	841,7044	998,7561	1020,7386	984,7769	1006,7594
	<b>32:5</b>	848,7121	853,6680	834,7328	839,6888	996,7405	1018,7230	982,7612	1004,7437
	<b>32:6</b>	846,6965	851,6524	832,7172	837,6731	994,7248	1016,7073	980,7456	1002,7281
	<b>34:5</b>	876,7434	881,6993	862,7641	867,7201	1024,7718	1046,7543	1010,7925	1032,7750
	<b>34:6</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
<b>20:5</b>	<b>20:5</b>	678,5087	683,4646	664,5294	669,4853	826,5370	848,5195	812,5578	834,5403
	<b>22:0</b>	716,6182	721,5741	702,6389	707,5949	864,6466	886,6291	850,6673	872,6498
	<b>22:1</b>	714,6026	719,5585	700,6233	705,5792	862,6309	884,6134	848,6517	870,6342
	<b>22:4</b>	708,5556	713,5115	694,5763	699,5323	856,5840	878,5665	842,6047	864,5872
	<b>22:5</b>	706,5400	711,4959	692,5607	697,5166	854,5683	876,5508	840,5891	862,5716
	<b>22:6</b>	704,5243	709,4802	690,5450	695,5010	852,5527	874,5352	838,5734	860,5559
	<b>24:0</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>24:1</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>24:2</b>	740,6182	745,5741	726,6389	731,5949	888,6466	910,6291	874,6673	896,6498
	<b>24:4</b>	736,5869	741,5428	722,6076	727,5636	884,6153	906,5978	870,6360	892,6185
	<b>24:5</b>	734,5713	739,5272	720,5920	725,5479	882,5996	904,5821	868,6204	890,6029
	<b>24:6</b>	732,5556	737,5115	718,5763	723,5323	880,5840	902,5665	866,6047	888,5872
	<b>26:3</b>	766,6339	771,5898	752,6546	757,6105	914,6622	936,6447	900,6830	922,6655
	<b>26:4</b>	764,6182	769,5741	750,6389	755,5949	912,6466	934,6291	898,6673	920,6498
	<b>26:5</b>	762,6026	767,5585	748,6233	753,5792	910,6309	932,6134	896,6517	918,6342
	<b>28:4</b>	792,6495	797,6054	778,6702	783,6262	940,6779	962,6604	926,6986	948,6811
	<b>28:5</b>	790,6339	795,5898	776,6546	781,6105	938,6622	960,6447	924,6830	946,6655
	<b>28:6</b>	788,6182	793,5741	774,6389	779,5949	936,6466	958,6291	922,6673	944,6498
	<b>30:4</b>	820,6808	825,6367	806,7015	811,6575	968,7092	990,6917	954,7299	976,7124
	<b>30:5</b>	818,6652	823,6211	804,6859	809,6418	966,6935	988,6760	952,7143	974,6968
	<b>30:6</b>	816,6495	821,6054	802,6702	807,6262	964,6779	986,6604	950,6986	972,6811
	<b>32:4</b>	848,7121	853,6680	834,7328	839,6888	996,7405	1018,7230	982,7612	1004,7437
	<b>32:5</b>	846,6965	851,6524	832,7172	837,6731	994,7248	1016,7073	980,7456	1002,7281
	<b>32:6</b>	844,6808	849,6367	830,7015	835,6575	992,7092	1014,6917	978,7299	1000,7124
	<b>34:5</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
	<b>34:6</b>	872,7121	877,6680	858,7328	863,6888	1020,7405	1042,7230	1006,7612	1028,7437
<b>22:0</b>	<b>22:0</b>	754,7278	759,6837	740,7485	745,7044	902,7561	924,7386	888,7769	910,7594
	<b>22:1</b>	752,7121	757,6680	738,7328	743,6888	900,7405	922,7230	886,7612	908,7437
	<b>22:4</b>	746,6652	751,6211	732,6859	737,6418	894,6935	916,6760	880,7143	902,6968
	<b>22:5</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>22:6</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>24:0</b>	782,7591	787,7150	768,7798	773,7357	930,7874	952,7699	916,8082	938,7907
	<b>24:1</b>	780,7434	785,6993	766,7641	771,7201	928,7718	950,7543	914,7925	936,7750

# ANHANG

	<b>24:2</b>	778,7278	783,6837	764,7485	769,7044	926,7561	948,7386	912,7769	934,7594
	<b>24:4</b>	774,6965	779,6524	760,7172	765,6731	922,7248	944,7073	908,7456	930,7281
	<b>24:5</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124
	<b>24:6</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>26:3</b>	804,7434	809,6993	790,7641	795,7201	952,7718	974,7543	938,7925	960,7750
	<b>26:4</b>	802,7278	807,6837	788,7485	793,7044	950,7561	972,7386	936,7769	958,7594
	<b>26:5</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>28:4</b>	830,7591	835,7150	816,7798	821,7357	978,7874	1000,7699	964,8082	986,7907
	<b>28:5</b>	828,7434	833,6993	814,7641	819,7201	976,7718	998,7543	962,7925	984,7750
	<b>28:6</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
	<b>30:4</b>	858,7904	863,7463	844,8111	849,7670	1006,8187	1028,8012	992,8395	1014,8220
	<b>30:5</b>	856,7747	861,7306	842,7954	847,7514	1004,8031	1026,7856	990,8238	1012,8063
	<b>30:6</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907
	<b>32:4</b>	886,8217	891,7776	872,8424	877,7983	1034,8500	1056,8325	1020,8708	1042,8533
	<b>32:5</b>	884,8060	889,7619	870,8267	875,7827	1032,8344	1054,8169	1018,8551	1040,8376
	<b>32:6</b>	882,7904	887,7463	868,8111	873,7670	1030,8187	1052,8012	1016,8395	1038,8220
	<b>34:5</b>	912,8373	917,7932	898,8580	903,8140	1060,8657	1082,8482	1046,8864	1068,8689
	<b>34:6</b>	910,8217	915,7776	896,8424	901,7983	1058,8500	1080,8325	1044,8708	1066,8533
<b>22:1</b>	<b>22:1</b>	750,6965	755,6524	736,7172	741,6731	898,7248	920,7073	884,7456	906,7281
	<b>22:4</b>	744,6495	749,6054	730,6702	735,6262	892,6779	914,6604	878,6986	900,6811
	<b>22:5</b>	742,6339	747,5898	728,6546	733,6105	890,6622	912,6447	876,6830	898,6655
	<b>22:6</b>	740,6182	745,5741	726,6389	731,5949	888,6466	910,6291	874,6673	896,6498
	<b>24:0</b>	780,7434	785,6993	766,7641	771,7201	928,7718	950,7543	914,7925	936,7750
	<b>24:1</b>	778,7278	783,6837	764,7485	769,7044	926,7561	948,7386	912,7769	934,7594
	<b>24:2</b>	776,7121	781,6680	762,7328	767,6888	924,7405	946,7230	910,7612	932,7437
	<b>24:4</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124
	<b>24:5</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>24:6</b>	768,6495	773,6054	754,6702	759,6262	916,6779	938,6604	902,6986	924,6811
	<b>26:3</b>	802,7278	807,6837	788,7485	793,7044	950,7561	972,7386	936,7769	958,7594
	<b>26:4</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>26:5</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>28:4</b>	828,7434	833,6993	814,7641	819,7201	976,7718	998,7543	962,7925	984,7750
	<b>28:5</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
	<b>28:6</b>	824,7121	829,6680	810,7328	815,6888	972,7405	994,7230	958,7612	980,7437
	<b>30:4</b>	856,7747	861,7306	842,7954	847,7514	1004,8031	1026,7856	990,8238	1012,8063
	<b>30:5</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907
	<b>30:6</b>	852,7434	857,6993	838,7641	843,7201	1000,7718	1022,7543	986,7925	1008,7750
	<b>32:4</b>	884,8060	889,7619	870,8267	875,7827	1032,8344	1054,8169	1018,8551	1040,8376
	<b>32:5</b>	882,7904	887,7463	868,8111	873,7670	1030,8187	1052,8012	1016,8395	1038,8220
	<b>32:6</b>	880,7747	885,7306	866,7954	871,7514	1028,8031	1050,7856	1014,8238	1036,8063
	<b>34:5</b>	910,8217	915,7776	896,8424	901,7983	1058,8500	1080,8325	1044,8708	1066,8533
	<b>34:6</b>	908,8060	913,7619	894,8267	899,7827	1056,8344	1078,8169	1042,8551	1064,8376
<b>22:4</b>	<b>22:4</b>	738,6026	743,5585	724,6233	729,5792	886,6309	908,6134	872,6517	894,6342
	<b>22:5</b>	736,5869	741,5428	722,6076	727,5636	884,6153	906,5978	870,6360	892,6185
	<b>22:6</b>	734,5713	739,5272	720,5920	725,5479	882,5996	904,5821	868,6204	890,6029
	<b>24:0</b>	774,6965	779,6524	760,7172	765,6731	922,7248	944,7073	908,7456	930,7281
	<b>24:1</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124

# ANHANG

	<b>24:2</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>24:4</b>	766,6339	771,5898	752,6546	757,6105	914,6622	936,6447	900,6830	922,6655
	<b>24:5</b>	764,6182	769,5741	750,6389	755,5949	912,6466	934,6291	898,6673	920,6498
	<b>24:6</b>	762,6026	767,5585	748,6233	753,5792	910,6309	932,6134	896,6517	918,6342
	<b>26:3</b>	796,6808	801,6367	782,7015	787,6575	944,7092	966,6917	930,7299	952,7124
	<b>26:4</b>	794,6652	799,6211	780,6859	785,6418	942,6935	964,6760	928,7143	950,6968
	<b>26:5</b>	792,6495	797,6054	778,6702	783,6262	940,6779	962,6604	926,6986	948,6811
	<b>28:4</b>	822,6965	827,6524	808,7172	813,6731	970,7248	992,7073	956,7456	978,7281
	<b>28:5</b>	820,6808	825,6367	806,7015	811,6575	968,7092	990,6917	954,7299	976,7124
	<b>28:6</b>	818,6652	823,6211	804,6859	809,6418	966,6935	988,6760	952,7143	974,6968
	<b>30:4</b>	850,7278	855,6837	836,7485	841,7044	998,7561	1020,7386	984,7769	1006,7594
	<b>30:5</b>	848,7121	853,6680	834,7328	839,6888	996,7405	1018,7230	982,7612	1004,7437
	<b>30:6</b>	846,6965	851,6524	832,7172	837,6731	994,7248	1016,7073	980,7456	1002,7281
	<b>32:4</b>	878,7591	883,7150	864,7798	869,7357	1026,7874	1048,7699	1012,8082	1034,7907
	<b>32:5</b>	876,7434	881,6993	862,7641	867,7201	1024,7718	1046,7543	1010,7925	1032,7750
	<b>32:6</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
	<b>34:5</b>	904,7747	909,7306	890,7954	895,7514	1052,8031	1074,7856	1038,8238	1060,8063
	<b>34:6</b>	902,7591	907,7150	888,7798	893,7357	1050,7874	1072,7699	1036,8082	1058,7907
<b>22:5</b>	<b>22:5</b>	734,5713	739,5272	720,5920	725,5479	882,5996	904,5821	868,6204	890,6029
	<b>22:6</b>	732,5556	737,5115	718,5763	723,5323	880,5840	902,5665	866,6047	888,5872
	<b>24:0</b>	772,6808	777,6367	758,7015	763,6575	920,7092	942,6917	906,7299	928,7124
	<b>24:1</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>24:2</b>	768,6495	773,6054	754,6702	759,6262	916,6779	938,6604	902,6986	924,6811
	<b>24:4</b>	764,6182	769,5741	750,6389	755,5949	912,6466	934,6291	898,6673	920,6498
	<b>24:5</b>	762,6026	767,5585	748,6233	753,5792	910,6309	932,6134	896,6517	918,6342
	<b>24:6</b>	760,5869	765,5428	746,6076	751,5636	908,6153	930,5978	894,6360	916,6185
	<b>26:3</b>	794,6652	799,6211	780,6859	785,6418	942,6935	964,6760	928,7143	950,6968
	<b>26:4</b>	792,6495	797,6054	778,6702	783,6262	940,6779	962,6604	926,6986	948,6811
	<b>26:5</b>	790,6339	795,5898	776,6546	781,6105	938,6622	960,6447	924,6830	946,6655
	<b>28:4</b>	820,6808	825,6367	806,7015	811,6575	968,7092	990,6917	954,7299	976,7124
	<b>28:5</b>	818,6652	823,6211	804,6859	809,6418	966,6935	988,6760	952,7143	974,6968
	<b>28:6</b>	816,6495	821,6054	802,6702	807,6262	964,6779	986,6604	950,6986	972,6811
	<b>30:4</b>	848,7121	853,6680	834,7328	839,6888	996,7405	1018,7230	982,7612	1004,7437
	<b>30:5</b>	846,6965	851,6524	832,7172	837,6731	994,7248	1016,7073	980,7456	1002,7281
	<b>30:6</b>	844,6808	849,6367	830,7015	835,6575	992,7092	1014,6917	978,7299	1000,7124
	<b>32:4</b>	876,7434	881,6993	862,7641	867,7201	1024,7718	1046,7543	1010,7925	1032,7750
	<b>32:5</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
	<b>32:6</b>	872,7121	877,6680	858,7328	863,6888	1020,7405	1042,7230	1006,7612	1028,7437
	<b>34:5</b>	902,7591	907,7150	888,7798	893,7357	1050,7874	1072,7699	1036,8082	1058,7907
	<b>34:6</b>	900,7434	905,6993	886,7641	891,7201	1048,7718	1070,7543	1034,7925	1056,7750
<b>22:6</b>	<b>22:6</b>	730,5400	735,4959	716,5607	721,5166	878,5683	900,5508	864,5891	886,5716
	<b>24:0</b>	770,6652	775,6211	756,6859	761,6418	918,6935	940,6760	904,7143	926,6968
	<b>24:1</b>	768,6495	773,6054	754,6702	759,6262	916,6779	938,6604	902,6986	924,6811
	<b>24:2</b>	766,6339	771,5898	752,6546	757,6105	914,6622	936,6447	900,6830	922,6655
	<b>24:4</b>	762,6026	767,5585	748,6233	753,5792	910,6309	932,6134	896,6517	918,6342
	<b>24:5</b>	760,5869	765,5428	746,6076	751,5636	908,6153	930,5978	894,6360	916,6185
	<b>24:6</b>	758,5713	763,5272	744,5920	749,5479	906,5996	928,5821	892,6204	914,6029

# ANHANG

	<b>26:3</b>	792,6495	797,6054	778,6702	783,6262	940,6779	962,6604	926,6986	948,6811
	<b>26:4</b>	790,6339	795,5898	776,6546	781,6105	938,6622	960,6447	924,6830	946,6655
	<b>26:5</b>	788,6182	793,5741	774,6389	779,5949	936,6466	958,6291	922,6673	944,6498
	<b>28:4</b>	818,6652	823,6211	804,6859	809,6418	966,6935	988,6760	952,7143	974,6968
	<b>28:5</b>	816,6495	821,6054	802,6702	807,6262	964,6779	986,6604	950,6986	972,6811
	<b>28:6</b>	814,6339	819,5898	800,6546	805,6105	962,6622	984,6447	948,6830	970,6655
	<b>30:4</b>	846,6965	851,6524	832,7172	837,6731	994,7248	1016,7073	980,7456	1002,7281
	<b>30:5</b>	844,6808	849,6367	830,7015	835,6575	992,7092	1014,6917	978,7299	1000,7124
	<b>30:6</b>	842,6652	847,6211	828,6859	833,6418	990,6935	1012,6760	976,7143	998,6968
	<b>32:4</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
	<b>32:5</b>	872,7121	877,6680	858,7328	863,6888	1020,7405	1042,7230	1006,7612	1028,7437
	<b>32:6</b>	870,6965	875,6524	856,7172	861,6731	1018,7248	1040,7073	1004,7456	1026,7281
	<b>34:5</b>	900,7434	905,6993	886,7641	891,7201	1048,7718	1070,7543	1034,7925	1056,7750
	<b>34:6</b>	898,7278	903,6837	884,7485	889,7044	1046,7561	1068,7386	1032,7769	1054,7594
<b>24:0</b>	<b>24:0</b>	810,7904	815,7463	796,8111	801,7670	958,8187	980,8012	944,8395	966,8220
	<b>24:1</b>	808,7747	813,7306	794,7954	799,7514	956,8031	978,7856	942,8238	964,8063
	<b>24:2</b>	806,7591	811,7150	792,7798	797,7357	954,7874	976,7699	940,8082	962,7907
	<b>24:4</b>	802,7278	807,6837	788,7485	793,7044	950,7561	972,7386	936,7769	958,7594
	<b>24:5</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>24:6</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>26:3</b>	832,7747	837,7306	818,7954	823,7514	980,8031	1002,7856	966,8238	988,8063
	<b>26:4</b>	830,7591	835,7150	816,7798	821,7357	978,7874	1000,7699	964,8082	986,7907
	<b>26:5</b>	828,7434	833,6993	814,7641	819,7201	976,7718	998,7543	962,7925	984,7750
	<b>28:4</b>	858,7904	863,7463	844,8111	849,7670	1006,8187	1028,8012	992,8395	1014,8220
	<b>28:5</b>	856,7747	861,7306	842,7954	847,7514	1004,8031	1026,7856	990,8238	1012,8063
	<b>28:6</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907
	<b>30:4</b>	886,8217	891,7776	872,8424	877,7983	1034,8500	1056,8325	1020,8708	1042,8533
	<b>30:5</b>	884,8060	889,7619	870,8267	875,7827	1032,8344	1054,8169	1018,8551	1040,8376
	<b>30:6</b>	882,7904	887,7463	868,8111	873,7670	1030,8187	1052,8012	1016,8395	1038,8220
	<b>32:4</b>	914,8530	919,8089	900,8737	905,8296	1062,8813	1084,8638	1048,9021	1070,8846
	<b>32:5</b>	912,8373	917,7932	898,8580	903,8140	1060,8657	1082,8482	1046,8864	1068,8689
	<b>32:6</b>	910,8217	915,7776	896,8424	901,7983	1058,8500	1080,8325	1044,8708	1066,8533
	<b>34:5</b>	940,8686	945,8245	926,8893	931,8453	1088,8970	1110,8795	1074,9177	1096,9002
	<b>34:6</b>	938,8530	943,8089	924,8737	929,8296	1086,8813	1108,8638	1072,9021	1094,8846
<b>24:1</b>	<b>24:1</b>	806,7591	811,7150	792,7798	797,7357	954,7874	976,7699	940,8082	962,7907
	<b>24:2</b>	804,7434	809,6993	790,7641	795,7201	952,7718	974,7543	938,7925	960,7750
	<b>24:4</b>	800,7121	805,6680	786,7328	791,6888	948,7405	970,7230	934,7612	956,7437
	<b>24:5</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>24:6</b>	796,6808	801,6367	782,7015	787,6575	944,7092	966,6917	930,7299	952,7124
	<b>26:3</b>	830,7591	835,7150	816,7798	821,7357	978,7874	1000,7699	964,8082	986,7907
	<b>26:4</b>	828,7434	833,6993	814,7641	819,7201	976,7718	998,7543	962,7925	984,7750
	<b>26:5</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
	<b>28:4</b>	856,7747	861,7306	842,7954	847,7514	1004,8031	1026,7856	990,8238	1012,8063
	<b>28:5</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907
	<b>28:6</b>	852,7434	857,6993	838,7641	843,7201	1000,7718	1022,7543	986,7925	1008,7750
	<b>30:4</b>	884,8060	889,7619	870,8267	875,7827	1032,8344	1054,8169	1018,8551	1040,8376
	<b>30:5</b>	882,7904	887,7463	868,8111	873,7670	1030,8187	1052,8012	1016,8395	1038,8220

## ANHANG

	<b>30:6</b>	880,7747	885,7306	866,7954	871,7514	1028,8031	1050,7856	1014,8238	1036,8063
	<b>32:4</b>	912,8373	917,7932	898,8580	903,8140	1060,8657	1082,8482	1046,8864	1068,8689
	<b>32:5</b>	910,8217	915,7776	896,8424	901,7983	1058,8500	1080,8325	1044,8708	1066,8533
	<b>32:6</b>	908,8060	913,7619	894,8267	899,7827	1056,8344	1078,8169	1042,8551	1064,8376
	<b>34:5</b>	938,8530	943,8089	924,8737	929,8296	1086,8813	1108,8638	1072,9021	1094,8846
	<b>34:6</b>	936,8373	941,7932	922,8580	927,8140	1084,8657	1106,8482	1070,8864	1092,8689
<b>24:2</b>	<b>24:2</b>	802,7278	807,6837	788,7485	793,7044	950,7561	972,7386	936,7769	958,7594
	<b>24:4</b>	798,6965	803,6524	784,7172	789,6731	946,7248	968,7073	932,7456	954,7281
	<b>24:5</b>	796,6808	801,6367	782,7015	787,6575	944,7092	966,6917	930,7299	952,7124
	<b>24:6</b>	794,6652	799,6211	780,6859	785,6418	942,6935	964,6760	928,7143	950,6968
	<b>26:3</b>	828,7434	833,6993	814,7641	819,7201	976,7718	998,7543	962,7925	984,7750
	<b>26:4</b>	826,7278	831,6837	812,7485	817,7044	974,7561	996,7386	960,7769	982,7594
	<b>26:5</b>	824,7121	829,6680	810,7328	815,6888	972,7405	994,7230	958,7612	980,7437
	<b>28:4</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907
	<b>28:5</b>	852,7434	857,6993	838,7641	843,7201	1000,7718	1022,7543	986,7925	1008,7750
	<b>28:6</b>	850,7278	855,6837	836,7485	841,7044	998,7561	1020,7386	984,7769	1006,7594
	<b>30:4</b>	882,7904	887,7463	868,8111	873,7670	1030,8187	1052,8012	1016,8395	1038,8220
	<b>30:5</b>	880,7747	885,7306	866,7954	871,7514	1028,8031	1050,7856	1014,8238	1036,8063
	<b>30:6</b>	878,7591	883,7150	864,7798	869,7357	1026,7874	1048,7699	1012,8082	1034,7907
	<b>32:4</b>	910,8217	915,7776	896,8424	901,7983	1058,8500	1080,8325	1044,8708	1066,8533
	<b>32:5</b>	908,8060	913,7619	894,8267	899,7827	1056,8344	1078,8169	1042,8551	1064,8376
	<b>32:6</b>	906,7904	911,7463	892,8111	897,7670	1054,8187	1076,8012	1040,8395	1062,8220
	<b>34:5</b>	936,8373	941,7932	922,8580	927,8140	1084,8657	1106,8482	1070,8864	1092,8689
	<b>34:6</b>	934,8217	939,7776	920,8424	925,7983	1082,8500	1104,8325	1068,8708	1090,8533
<b>24:4</b>	<b>24:4</b>	794,6652	799,6211	780,6859	785,6418	942,6935	964,6760	928,7143	950,6968
	<b>24:5</b>	792,6495	797,6054	778,6702	783,6262	940,6779	962,6604	926,6986	948,6811
	<b>24:6</b>	790,6339	795,5898	776,6546	781,6105	938,6622	960,6447	924,6830	946,6655
	<b>26:3</b>	824,7121	829,6680	810,7328	815,6888	972,7405	994,7230	958,7612	980,7437
	<b>26:4</b>	822,6965	827,6524	808,7172	813,6731	970,7248	992,7073	956,7456	978,7281
	<b>26:5</b>	820,6808	825,6367	806,7015	811,6575	968,7092	990,6917	954,7299	976,7124
	<b>28:4</b>	850,7278	855,6837	836,7485	841,7044	998,7561	1020,7386	984,7769	1006,7594
	<b>28:5</b>	848,7121	853,6680	834,7328	839,6888	996,7405	1018,7230	982,7612	1004,7437
	<b>28:6</b>	846,6965	851,6524	832,7172	837,6731	994,7248	1016,7073	980,7456	1002,7281
	<b>30:4</b>	878,7591	883,7150	864,7798	869,7357	1026,7874	1048,7699	1012,8082	1034,7907
	<b>30:5</b>	876,7434	881,6993	862,7641	867,7201	1024,7718	1046,7543	1010,7925	1032,7750
	<b>30:6</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
	<b>32:4</b>	906,7904	911,7463	892,8111	897,7670	1054,8187	1076,8012	1040,8395	1062,8220
	<b>32:5</b>	904,7747	909,7306	890,7954	895,7514	1052,8031	1074,7856	1038,8238	1060,8063
	<b>32:6</b>	902,7591	907,7150	888,7798	893,7357	1050,7874	1072,7699	1036,8082	1058,7907
	<b>34:5</b>	932,8060	937,7619	918,8267	923,7827	1080,8344	1102,8169	1066,8551	1088,8376
	<b>34:6</b>	930,7904	935,7463	916,8111	921,7670	1078,8187	1100,8012	1064,8395	1086,8220
<b>24:5</b>	<b>24:5</b>	790,6339	795,5898	776,6546	781,6105	938,6622	960,6447	924,6830	946,6655
	<b>24:6</b>	788,6182	793,5741	774,6389	779,5949	936,6466	958,6291	922,6673	944,6498
	<b>26:3</b>	822,6965	827,6524	808,7172	813,6731	970,7248	992,7073	956,7456	978,7281
	<b>26:4</b>	820,6808	825,6367	806,7015	811,6575	968,7092	990,6917	954,7299	976,7124
	<b>26:5</b>	818,6652	823,6211	804,6859	809,6418	966,6935	988,6760	952,7143	974,6968

# ANHANG

	<b>28:4</b>	848,7121	853,6680	834,7328	839,6888	996,7405	1018,7230	982,7612	1004,7437
	<b>28:5</b>	846,6965	851,6524	832,7172	837,6731	994,7248	1016,7073	980,7456	1002,7281
	<b>28:6</b>	844,6808	849,6367	830,7015	835,6575	992,7092	1014,6917	978,7299	1000,7124
	<b>30:4</b>	876,7434	881,6993	862,7641	867,7201	1024,7718	1046,7543	1010,7925	1032,7750
	<b>30:5</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
	<b>30:6</b>	872,7121	877,6680	858,7328	863,6888	1020,7405	1042,7230	1006,7612	1028,7437
	<b>32:4</b>	904,7747	909,7306	890,7954	895,7514	1052,8031	1074,7856	1038,8238	1060,8063
	<b>32:5</b>	902,7591	907,7150	888,7798	893,7357	1050,7874	1072,7699	1036,8082	1058,7907
	<b>32:6</b>	900,7434	905,6993	886,7641	891,7201	1048,7718	1070,7543	1034,7925	1056,7750
	<b>34:5</b>	930,7904	935,7463	916,8111	921,7670	1078,8187	1100,8012	1064,8395	1086,8220
	<b>34:6</b>	928,7747	933,7306	914,7954	919,7514	1076,8031	1098,7856	1062,8238	1084,8063
<b>24:6</b>	<b>24:6</b>	786,6026	791,5585	772,6233	777,5792	934,6309	956,6134	920,6517	942,6342
	<b>26:3</b>	820,6808	825,6367	806,7015	811,6575	968,7092	990,6917	954,7299	976,7124
	<b>26:4</b>	818,6652	823,6211	804,6859	809,6418	966,6935	988,6760	952,7143	974,6968
	<b>26:5</b>	816,6495	821,6054	802,6702	807,6262	964,6779	986,6604	950,6986	972,6811
	<b>28:4</b>	846,6965	851,6524	832,7172	837,6731	994,7248	1016,7073	980,7456	1002,7281
	<b>28:5</b>	844,6808	849,6367	830,7015	835,6575	992,7092	1014,6917	978,7299	1000,7124
	<b>28:6</b>	842,6652	847,6211	828,6859	833,6418	990,6935	1012,6760	976,7143	998,6968
	<b>30:4</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
	<b>30:5</b>	872,7121	877,6680	858,7328	863,6888	1020,7405	1042,7230	1006,7612	1028,7437
	<b>30:6</b>	870,6965	875,6524	856,7172	861,6731	1018,7248	1040,7073	1004,7456	1026,7281
	<b>32:4</b>	902,7591	907,7150	888,7798	893,7357	1050,7874	1072,7699	1036,8082	1058,7907
	<b>32:5</b>	900,7434	905,6993	886,7641	891,7201	1048,7718	1070,7543	1034,7925	1056,7750
	<b>32:6</b>	898,7278	903,6837	884,7485	889,7044	1046,7561	1068,7386	1032,7769	1054,7594
	<b>34:5</b>	928,7747	933,7306	914,7954	919,7514	1076,8031	1098,7856	1062,8238	1084,8063
	<b>34:6</b>	926,7591	931,7150	912,7798	917,7357	1074,7874	1096,7699	1060,8082	1082,7907
<b>26:3</b>	<b>26:3</b>	854,7591	859,7150	840,7798	845,7357	1002,7874	1024,7699	988,8082	1010,7907
	<b>26:4</b>	852,7434	857,6993	838,7641	843,7201	1000,7718	1022,7543	986,7925	1008,7750
	<b>26:5</b>	850,7278	855,6837	836,7485	841,7044	998,7561	1020,7386	984,7769	1006,7594
	<b>28:4</b>	880,7747	885,7306	866,7954	871,7514	1028,8031	1050,7856	1014,8238	1036,8063
	<b>28:5</b>	878,7591	883,7150	864,7798	869,7357	1026,7874	1048,7699	1012,8082	1034,7907
	<b>28:6</b>	876,7434	881,6993	862,7641	867,7201	1024,7718	1046,7543	1010,7925	1032,7750
	<b>30:4</b>	908,8060	913,7619	894,8267	899,7827	1056,8344	1078,8169	1042,8551	1064,8376
	<b>30:5</b>	906,7904	911,7463	892,8111	897,7670	1054,8187	1076,8012	1040,8395	1062,8220
	<b>30:6</b>	904,7747	909,7306	890,7954	895,7514	1052,8031	1074,7856	1038,8238	1060,8063
	<b>32:4</b>	936,8373	941,7932	922,8580	927,8140	1084,8657	1106,8482	1070,8864	1092,8689
	<b>32:5</b>	934,8217	939,7776	920,8424	925,7983	1082,8500	1104,8325	1068,8708	1090,8533
	<b>32:6</b>	932,8060	937,7619	918,8267	923,7827	1080,8344	1102,8169	1066,8551	1088,8376
	<b>34:5</b>	962,8530	967,8089	948,8737	953,8296	1110,8813	1132,8638	1096,9021	1118,8846
	<b>34:6</b>	960,8373	965,7932	946,8580	951,8140	1108,8657	1130,8482	1094,8864	1116,8689
<b>26:4</b>	<b>26:4</b>	850,7278	855,6837	836,7485	841,7044	998,7561	1020,7386	984,7769	1006,7594
	<b>26:5</b>	848,7121	853,6680	834,7328	839,6888	996,7405	1018,7230	982,7612	1004,7437
	<b>28:4</b>	878,7591	883,7150	864,7798	869,7357	1026,7874	1048,7699	1012,8082	1034,7907
	<b>28:5</b>	876,7434	881,6993	862,7641	867,7201	1024,7718	1046,7543	1010,7925	1032,7750
	<b>28:6</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
	<b>30:4</b>	906,7904	911,7463	892,8111	897,7670	1054,8187	1076,8012	1040,8395	1062,8220

## ANHANG

	<b>30:5</b>	904,7747	909,7306	890,7954	895,7514	1052,8031	1074,7856	1038,8238	1060,8063
	<b>30:6</b>	902,7591	907,7150	888,7798	893,7357	1050,7874	1072,7699	1036,8082	1058,7907
	<b>32:4</b>	934,8217	939,7776	920,8424	925,7983	1082,8500	1104,8325	1068,8708	1090,8533
	<b>32:5</b>	932,8060	937,7619	918,8267	923,7827	1080,8344	1102,8169	1066,8551	1088,8376
	<b>32:6</b>	930,7904	935,7463	916,8111	921,7670	1078,8187	1100,8012	1064,8395	1086,8220
	<b>34:5</b>	936,8373	941,7932	922,8580	927,8140	1084,8657	1106,8482	1070,8864	1092,8689
	<b>34:6</b>	934,8217	939,7776	920,8424	925,7983	1082,8500	1104,8325	1068,8708	1090,8533
<b>26:5</b>	<b>26:5</b>	846,6965	851,6524	832,7172	837,6731	994,7248	1016,7073	980,7456	1002,7281
	<b>28:4</b>	876,7434	881,6993	862,7641	867,7201	1024,7718	1046,7543	1010,7925	1032,7750
	<b>28:5</b>	874,7278	879,6837	860,7485	865,7044	1022,7561	1044,7386	1008,7769	1030,7594
	<b>28:6</b>	872,7121	877,6680	858,7328	863,6888	1020,7405	1042,7230	1006,7612	1028,7437
	<b>30:4</b>	904,7747	909,7306	890,7954	895,7514	1052,8031	1074,7856	1038,8238	1060,8063
	<b>30:5</b>	902,7591	907,7150	888,7798	893,7357	1050,7874	1072,7699	1036,8082	1058,7907
	<b>30:6</b>	900,7434	905,6993	886,7641	891,7201	1048,7718	1070,7543	1034,7925	1056,7750
	<b>32:4</b>	932,8060	937,7619	918,8267	923,7827	1080,8344	1102,8169	1066,8551	1088,8376
	<b>32:5</b>	930,7904	935,7463	916,8111	921,7670	1078,8187	1100,8012	1064,8395	1086,8220
	<b>32:6</b>	928,7747	933,7306	914,7954	919,7514	1076,8031	1098,7856	1062,8238	1084,8063
	<b>34:5</b>	958,8217	963,7776	944,8424	949,7983	1106,8500	1128,8325	1092,8708	1114,8533
	<b>34:6</b>	956,8060	961,7619	942,8267	947,7827	1104,8344	1126,8169	1090,8551	1112,8376
<b>28:4</b>	<b>28:4</b>	906,7904	911,7463	892,8111	897,7670	1054,8187	1076,8012	1040,8395	1062,8220
	<b>28:5</b>	904,7747	909,7306	890,7954	895,7514	1052,8031	1074,7856	1038,8238	1060,8063
	<b>28:6</b>	902,7591	907,7150	888,7798	893,7357	1050,7874	1072,7699	1036,8082	1058,7907
	<b>30:4</b>	934,8217	939,7776	920,8424	925,7983	1082,8500	1104,8325	1068,8708	1090,8533
	<b>30:5</b>	932,8060	937,7619	918,8267	923,7827	1080,8344	1102,8169	1066,8551	1088,8376
	<b>30:6</b>	930,7904	935,7463	916,8111	921,7670	1078,8187	1100,8012	1064,8395	1086,8220
	<b>32:4</b>	938,8530	943,8089	924,8737	929,8296	1086,8813	1108,8638	1072,9021	1094,8846
	<b>32:5</b>	960,8373	965,7932	946,8580	951,8140	1108,8657	1130,8482	1094,8864	1116,8689
	<b>32:6</b>	958,8217	963,7776	944,8424	949,7983	1106,8500	1128,8325	1092,8708	1114,8533
	<b>34:5</b>	988,8686	993,8245	974,8893	979,8453	1136,8970	1158,8795	1122,9177	1144,9002
	<b>34:6</b>	986,8530	991,8089	972,8737	977,8296	1134,8813	1156,8638	1120,9021	1142,8846
<b>28:5</b>	<b>28:5</b>	902,7591	907,7150	888,7798	893,7357	1050,7874	1072,7699	1036,8082	1058,7907
	<b>28:6</b>	900,7434	905,6993	886,7641	891,7201	1048,7718	1070,7543	1034,7925	1056,7750
	<b>30:4</b>	932,8060	937,7619	918,8267	923,7827	1080,8344	1102,8169	1066,8551	1088,8376
	<b>30:5</b>	930,7904	935,7463	916,8111	921,7670	1078,8187	1100,8012	1064,8395	1086,8220
	<b>30:6</b>	928,7747	933,7306	914,7954	919,7514	1076,8031	1098,7856	1062,8238	1084,8063
	<b>32:4</b>	960,8373	965,7932	946,8580	951,8140	1108,8657	1130,8482	1094,8864	1116,8689
	<b>32:5</b>	958,8217	963,7776	944,8424	949,7983	1106,8500	1128,8325	1092,8708	1114,8533
	<b>32:6</b>	956,8060	961,7619	942,8267	947,7827	1104,8344	1126,8169	1090,8551	1112,8376
	<b>34:5</b>	962,8530	967,8089	948,8737	953,8296	1110,8813	1132,8638	1096,9021	1118,8846
	<b>34:6</b>	960,8373	965,7932	946,8580	951,8140	1108,8657	1130,8482	1094,8864	1116,8689
<b>28:6</b>	<b>28:6</b>	898,7278	903,6837	884,7485	889,7044	1046,7561	1068,7386	1032,7769	1054,7594
	<b>30:4</b>	930,7904	935,7463	916,8111	921,7670	1078,8187	1100,8012	1064,8395	1086,8220
	<b>30:5</b>	928,7747	933,7306	914,7954	919,7514	1076,8031	1098,7856	1062,8238	1084,8063
	<b>30:6</b>	926,7591	931,7150	912,7798	917,7357	1074,7874	1096,7699	1060,8082	1082,7907
	<b>32:4</b>	958,8217	963,7776	944,8424	949,7983	1106,8500	1128,8325	1092,8708	1114,8533

## ANHANG

	<b>32:5</b>	956,8060	961,7619	942,8267	947,7827	1104,8344	1126,8169	1090,8551	1112,8376
	<b>32:6</b>	954,7904	959,7463	940,8111	945,7670	1102,8187	1124,8012	1088,8395	1110,8220
	<b>34:5</b>	984,8373	989,7932	970,8580	975,8140	1132,8657	1154,8482	1118,8864	1140,8689
	<b>34:6</b>	982,8217	987,7776	968,8424	973,7983	1130,8500	1152,8325	1116,8708	1138,8533
<b>30:4</b>	<b>30:4</b>	986,8530	991,8089	972,8737	977,8296	1134,8813	1156,8638	1120,9021	1142,8846
	<b>30:5</b>	984,8373	989,7932	970,8580	975,8140	1132,8657	1154,8482	1118,8864	1140,8689
	<b>30:6</b>	982,8217	987,7776	968,8424	973,7983	1130,8500	1152,8325	1116,8708	1138,8533
	<b>32:4</b>	990,8843	995,8402	976,9050	981,8609	1138,9126	1160,8951	1124,9334	1146,9159
	<b>32:5</b>	988,8686	993,8245	974,8893	979,8453	1136,8970	1158,8795	1122,9177	1144,9002
	<b>32:6</b>	986,8530	991,8089	972,8737	977,8296	1134,8813	1156,8638	1120,9021	1142,8846
	<b>34:5</b>	1016,8999	1021,8558	1002,9206	1007,8766	1164,9283	1186,9108	1150,9490	1172,9315
	<b>34:6</b>	1014,8843	1019,8402	1000,9050	1005,8609	1162,9126	1184,8951	1148,9334	1170,9159
<b>30:5</b>	<b>30:5</b>	958,8217	963,7776	944,8424	949,7983	1106,8500	1128,8325	1092,8708	1114,8533
	<b>30:6</b>	956,8060	961,7619	942,8267	947,7827	1104,8344	1126,8169	1090,8551	1112,8376
	<b>32:4</b>	988,8686	993,8245	974,8893	979,8453	1136,8970	1158,8795	1122,9177	1144,9002
	<b>32:5</b>	986,8530	991,8089	972,8737	977,8296	1134,8813	1156,8638	1120,9021	1142,8846
	<b>32:6</b>	984,8373	989,7932	970,8580	975,8140	1132,8657	1154,8482	1118,8864	1140,8689
	<b>34:5</b>	1014,8843	1019,8402	1000,9050	1005,8609	1162,9126	1184,8951	1148,9334	1170,9159
	<b>34:6</b>	1012,8686	1017,8245	998,8893	1003,8453	1160,8970	1182,8795	1146,9177	1168,9002
	<b>30:6</b>	<b>30:6</b>	954,7904	959,7463	940,8111	945,7670	1102,8187	1124,8012	1088,8395
	<b>32:4</b>	986,8530	991,8089	972,8737	977,8296	1134,8813	1156,8638	1120,9021	1142,8846
	<b>32:5</b>	984,8373	989,7932	970,8580	975,8140	1132,8657	1154,8482	1118,8864	1140,8689
	<b>32:6</b>	982,8217	987,7776	968,8424	973,7983	1130,8500	1152,8325	1116,8708	1138,8533
	<b>34:5</b>	1012,8686	1017,8245	998,8893	1003,8453	1160,8970	1182,8795	1146,9177	1168,9002
	<b>34:6</b>	1010,8530	1015,8089	996,8737	1001,8296	1158,8813	1180,8638	1144,9021	1166,8846
<b>32:4</b>	<b>32:4</b>	1018,9156	1023,8715	1004,9363	1009,8922	1166,9439	1188,9264	1152,9647	1174,9472
	<b>32:5</b>	1016,8999	1021,8558	1002,9206	1007,8766	1164,9283	1186,9108	1150,9490	1172,9315
	<b>32:6</b>	1014,8843	1019,8402	1000,9050	1005,8609	1162,9126	1184,8951	1148,9334	1170,9159
	<b>34:5</b>	1044,9312	1049,8871	1030,9519	1035,9079	1192,9596	1214,9421	1178,9803	1200,9628
	<b>34:6</b>	1042,9156	1047,8715	1028,9363	1033,8922	1190,9439	1212,9264	1176,9647	1198,9472
	<b>32:5</b>	<b>32:5</b>	1014,8843	1019,8402	1000,9050	1005,8609	1162,9126	1184,8951	1148,9334
	<b>32:6</b>	1012,8686	1017,8245	998,8893	1003,8453	1160,8970	1182,8795	1146,9177	1168,9002
	<b>34:5</b>	1042,9156	1047,8715	1028,9363	1033,8922	1190,9439	1212,9264	1176,9647	1198,9472
	<b>34:6</b>	1040,8999	1045,8558	1026,9206	1031,8766	1188,9283	1210,9108	1174,9490	1196,9315
<b>32:6</b>	<b>32:6</b>	1010,8530	1015,8089	996,8737	1001,8296	1158,8813	1180,8638	1144,9021	1166,8846
	<b>34:5</b>	1040,8999	1045,8558	1026,9206	1031,8766	1188,9283	1210,9108	1174,9490	1196,9315
	<b>34:6</b>	1038,8843	1043,8402	1024,9050	1029,8609	1186,9126	1208,8951	1172,9334	1194,9159
<b>34:5</b>	<b>34:5</b>	1070,9469	1075,9028	1056,9676	1061,9235	1218,9752	1240,9577	1204,9960	1226,9785
	<b>34:6</b>	1068,9312	1073,8871	1054,9519	1059,9079	1216,9596	1238,9421	1202,9803	1224,9628
<b>34:6</b>	<b>34:6</b>	1066,9156	1071,8715	1052,9363	1057,8922	1214,9439	1236,9264	1200,9647	1222,9472

## 8.1.2 Deskriptive Statistiken

Statistische Kennzahlen zu den jeweils durchgeführten Experimenten (siehe 8.1.3).

(Abkürzungen: [N] – gültige Fallzahl, [MW] – Mittelwert, [STABW] – Standardabweichung, [MIN] – minimaler Wert, [MAX] – maximaler Wert, [MED] – Median: der mittlere Wert in der Rangordnung, hier liegen 50% der geordneten Werte. [25%] - erstes Quartil, hier liegen 25% der geordneten Werte, [75%] - drittes Quartil, hier liegen 75% der geordneten Werte).

### Gesamtmotilität nach 48 h TRT-30 min (TRT-30, 48 h)

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	16	55,59	12,69	56,20	21,46	78,20	49,85	62,92
K 17°C	16	74,34	9,04	74,88	58,82	87,42	70,51	79,80
16:1	16	66,27	13,38	65,26	26,20	86,38	62,06	75,75
18:1	16	60,05	16,84	63,46	14,25	80,49	54,01	70,41
20:5	16	55,81	12,32	53,82	23,18	79,53	50,67	64,22
18:2	16	62,26	14,68	63,72	17,99	82,52	57,62	70,96
18:3	16	62,20	14,01	62,02	20,56	79,26	56,65	71,76

### Prog. Motilität nach 48 h TRT-30 min (TRT-30, 48 h)

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	16	49,71	13,58	49,24	16,59	76,16	43,97	58,96
K 17°C	16	69,58	10,93	71,72	50,31	86,00	63,68	75,32
16:1	16	59,55	14,78	59,06	19,31	83,44	52,47	70,57
18:1	16	53,47	17,60	53,06	8,11	78,02	45,95	64,51
20:5	16	50,61	13,33	49,35	18,88	78,62	42,55	61,40
18:2	16	56,22	15,25	57,55	14,01	81,01	50,60	64,58
18:3	16	55,74	15,41	54,05	14,43	77,13	49,21	65,73

### Gesamtmotilität nach 48 h TRT-300 min (TRT-300, 48 h)

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	16	33,00	17,69	28,57	8,01	68,14	20,20	46,76
K 17°C	16	50,49	18,26	52,59	11,63	78,16	41,03	61,26
16:1	16	49,88	16,33	47,72	17,19	73,39	39,12	65,05
18:1	16	48,98	13,95	47,34	25,48	72,89	39,36	60,69
20:5	16	44,73	14,99	47,26	21,01	71,47	33,82	54,81
18:2	16	52,82	11,61	53,47	35,14	73,33	42,86	59,44
18:3	16	49,22	14,13	46,93	21,43	73,81	42,41	60,06

### Prog. Motilität 48 h TRT-300 min (TRT-300, 48 h)

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	16	29,47	17,09	25,93	6,85	63,73	15,48	42,00
K 17°C	16	46,11	18,43	49,18	10,67	75,63	34,39	57,40
16:1	16	45,67	16,26	42,41	15,52	70,60	34,04	60,74
18:1	16	43,91	13,67	41,44	21,67	67,64	34,65	53,57
20:5	16	40,20	15,03	40,10	16,51	68,32	30,07	49,58
18:2	16	47,90	11,77	47,94	29,13	70,74	38,07	55,57
18:3	16	44,46	14,16	41,98	19,57	70,57	36,23	56,05

### Gesamtmotilität 168 h TRT-30 min (TRT-30, 168 h)

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	13	49,26	13,79	47,95	19,20	71,56	45,17	55,42
K 17°C	13	70,94	10,32	69,57	52,54	88,21	66,07	75,10
16:1	13	62,57	16,07	64,30	18,65	86,39	59,61	68,84
18:1	13	48,71	19,58	50,48	7,17	79,90	41,41	58,12
20:5	13	52,00	16,52	52,14	16,58	75,73	40,60	61,46
18:2	13	54,76	17,17	57,56	10,59	79,58	49,50	62,20
18:3	13	56,56	17,82	59,14	12,33	82,24	49,73	65,59

## ANHANG

### Prog. Motilität 168 h TRT-30 min (TRT-30, 168 h)

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	13	44,62	14,52	43,86	17,03	70,61	35,69	51,98
K 17°C	13	67,18	11,24	66,94	47,46	86,82	61,45	72,20
16:1	13	57,24	16,16	57,61	17,44	83,54	49,70	64,86
18:1	13	44,21	18,94	45,91	6,68	77,56	33,97	50,00
20:5	13	46,75	17,05	45,40	13,71	73,11	36,07	56,92
18:2	13	49,73	17,10	51,21	8,83	76,75	45,72	56,11
18:3	13	51,98	17,42	53,56	11,32	79,05	43,63	60,89

### Gesamtmotilität 168 h TRT-300 min (TRT-300, 168 h)

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	13	31,09	20,29	24,86	2,16	71,36	18,16	39,04
K 17°C	13	45,35	19,66	38,52	9,30	72,11	34,21	64,39
16:1	13	41,57	18,30	38,95	9,70	71,92	28,56	53,15
18:1	13	37,51	17,27	31,17	15,83	75,54	28,45	41,68
20:5	13	36,11	17,37	36,29	9,53	62,26	26,98	43,63
18:2	13	41,66	16,32	39,42	17,80	76,61	35,25	46,98
18:3	13	38,89	21,31	36,66	7,53	68,56	23,39	54,31

### Prog. Motilität 168 h 300 min (TRT-300, 168 h)

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	13	28,65	19,87	23,76	1,62	68,58	16,08	35,09
K 17°C	13	41,69	19,36	35,76	7,97	68,30	27,43	59,51
16:1	13	37,78	17,99	36,10	6,80	69,52	24,22	48,59
18:1	13	33,67	16,89	28,19	13,71	72,57	24,60	37,61
20:5	13	32,61	16,86	31,71	6,13	58,72	24,30	39,91
18:2	13	38,34	16,38	34,26	16,27	74,30	32,18	42,41
18:3	13	36,05	20,54	34,63	5,90	66,75	21,83	50,32

### Vitalitätstest, Rh123/PI nach 72 h

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	16	59,62	12,05	61,25	36,48	85,77	50,71	67,35
K 17°C	16	78,23	5,66	78,35	66,58	89,93	74,84	80,75
16:1	16	70,53	10,59	71,36	47,56	89,50	62,49	78,82
18:1	16	72,05	10,55	75,03	50,57	89,97	65,04	78,43
20:5	16	61,40	12,83	65,30	30,13	84,58	51,70	68,61
18:2	16	68,11	11,54	69,72	42,30	89,75	59,11	75,80
18:3	16	67,85	14,71	70,88	26,84	85,60	60,83	77,85

### Akrosomdefekter Spermatozoen nach 24 h

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	16	7,0	2,6	6,5	3,5	12,0	5,3	8,5
K 17°C	16	4,8	1,7	4,8	1,5	7,5	3,5	6,0
16:1	16	5,8	3,2	5,0	2,0	16,0	4,0	6,8
18:1	16	6,6	2,7	6,5	2,5	12,5	4,8	8,3
20:5	16	6,7	3,0	5,8	2,5	15,0	5,0	8,5
18:2	16	6,5	1,9	6,8	3,5	10,0	5,0	8,0
18:3	16	6,0	1,5	6,0	3,0	9,5	5,0	6,5

### Akrosomdefekter Spermatozoen nach 72 h

	N	MW	STABW	MED	MIN	MAX	25%	75%
K 6°C	16	10,3	5,2	9,3	4,0	27,5	8,5	10,5
K 17°C	16	6,5	3,2	6,0	2,0	16,0	5,5	7,0
16:1	16	7,3	3,0	6,8	3,0	13,0	4,8	8,8
18:1	16	8,5	3,1	8,8	3,5	15,0	6,5	10,5
20:5	16	9,7	3,7	9,5	4,0	17,0	7,5	11,0
18:2	16	9,3	3,6	8,8	4,5	16,0	6,5	12,5
18:3	16	8,2	2,6	8,5	2,5	13,0	6,5	10,0

### 8.1.3 Ausführliche Darstellung der Testergebnisse

**Tabelle A1. TRT-30 min nach 48 h (Gesamtmotilität)**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	16:1 - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	18:1 - K 6°C	16	6,40	9,45	0,064		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	16	9,50	7,90	0,597		
	18:2 - K 6°C	16	3,50	9,21	0,001		
	18:3 - K 6°C	16	2,00	8,93	0,000		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	16:1 - K 17°C	16	9,07	4,50	0,001		
	18:1 - K 17°C	16	8,93	2,00	0,000		
	20:5 - K 17°C	16	8,50	0,00	0,000		
	18:2 - K 17°C	16	9,50	1,50	0,000		
	18:3 - K 17°C	16	9,50	1,50	0,000		
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:1 - 16:1	16	9,62	3,67	0,002		0,012
	20:5 - 16:1	16	8,50	0,00	0,000		0,000
	18:2 - 16:1	16	9,31	5,00	0,004		0,021
	18:3 - 16:1	16	8,33	11,00	0,002		0,012
	20:5 - 18:1	16	8,00	10,67	0,065	0,000	0,262
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:2 - 18:1	16	8,50	8,50	0,404		0,807
	18:3 - 18:1	16	7,67	9,00	0,274		0,823
	18:2 - 20:5	16	8,00	8,53	0,001		0,006
	18:3 - 20:5	16	2,50	9,36	0,000		0,003
	18:3 - 18:2	16	11,67	6,60	0,929		0,929

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

ANHANG

**Tabelle A2. TRT-30 min nach 48 h (progressive Motilität)**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6 C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	16:1 - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	18:1 - K 6°C	16	9,50	8,17	0,130		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	16	7,29	9,44	0,404		
	18:2 - K 6°C	16	1,50	9,50	0,000		
	18:3 - K 6°C	16	2,67	9,85	0,001		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	16:1 - K 17°C	16	9,29	3,00	0,000		
	18:1 - K 17°C	16	9,00	1,00	0,000		
	20:5 - K 17°C	16	8,50	0,00	0,000		
	18:2 - K 17°C	16	9,00	1,00	0,000		
	18:3 - K 17°C	16	9,50	1,50	0,000		
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:1 - 16:1	16	10,17	3,50	0,003		0,023
	20:5 - 16:1	16	8,50	0,00	0,000		0,000
	18:2 - 16:1	16	8,54	8,33	0,025		0,150
	18:3 - 16:1	16	10,09	5,00	0,025		0,148
	20:5 - 18:1	16	7,83	10,50	0,193	0,000	0,578
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:2 - 18:1	16	8,40	8,55	0,193		0,578
	18:3 - 18:1	16	10,25	7,92	0,175		0,701
	18:2 - 20:5	16	5,50	8,93	0,002		0,013
	18:3 - 20:5	16	5,00	9,00	0,001		0,012
	18:3 - 18:2	16	10,29	7,11	0,860		0,860

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

ANHANG

**Tabelle A3. TRT-300 min nach 48 h (Gesamtmotilität)**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6 C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	16	1,00	9,00	0,000		
	16:1 - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	18:1 - K 6°C	16	2,00	8,93	0,000		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	16	3,50	9,21	0,001		
	18:2 - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	18:3 - K 6°C	16	2,50	9,36	0,000		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	16:1 - K 17°C	16	9,57	7,67	0,980		
	18:1 - K 17°C	16	8,56	8,43	0,669		
	20:5 - K 17°C	16	9,70	6,50	0,144		
	18:2 - K 17°C	16	7,50	9,50	0,706		
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:3 - K 17°C	16	7,80	9,67	0,632		
	18:1 - 16:1	16	8,56	8,43	0,669		1,000
	20:5 - 16:1	16	9,27	4,50	0,015		0,136
	18:2 - 16:1	16	7,00	9,67	0,348		1,000
	18:3 - 16:1	16	7,50	10,17	0,744		1,000
	20:5 - 18:1	16	8,83	7,50	0,051	0,027*	0,355
	18:2 - 18:1	16	7,17	9,30	0,211		1,000
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:3 - 18:1	16	8,38	8,63	0,980		0,980
	18:2 - 20:5	16	4,00	9,54	0,002		0,021
	18:3 - 20:5	16	7,25	8,92	0,044		0,354
	18:3 - 18:2	16	9,09	7,20	0,105		0,628

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

\* Monte-Carlo-Simulation

ANHANG

**Tabelle A4. TRT-300 min nach 48 h (progressive Motilität)**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	16:1 - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	18:1 - K 6°C	16	1,50	9,50	0,000		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	16	3,50	9,21	0,001		
	18:2 - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	18:3 - K 6°C	16	2,00	9,43	0,000		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	16:1 - K 17°C	16	8,25	8,75	0,940		
	18:1 - K 17°C	16	9,00	7,86	0,528		
	20:5 - K 17°C	16	8,91	7,60	0,130		
	18:2 - K 17°C	16	8,43	8,56	0,669		
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:3 - K 17°C	16	8,22	8,86	0,782		
	18:1 - 16:1	16	9,22	7,57	0,464		
	20:5 - 16:1	16	10,64	3,80	0,009		
	18:2 - 16:1	16	8,17	8,70	0,348		
	18:3 - 16:1	16	9,11	7,71	0,495		
	20:5 - 18:1	16	9,64	6,00	0,051	0,060	Post-Hoc dürfen nicht interpretiert werden
	18:2 - 18:1	16	6,00	10,00	0,105		
18:3 - 18:1	16	7,63	9,38	0,744			
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:2 - 20:5	16	5,33	9,23	0,005		
	18:3 - 20:5	16	7,50	8,83	0,051		
	18:3 - 18:2	16	9,70	6,50	0,144		

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

ANHANG

**Tabelle A5. TRT-30 min nach 168 h (Gesamtmotilität)**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	13	0,00	7,00	0,000		
	16:1 - K 6°C	13	1,00	7,50	0,000		
	18:1 - K 6°C	13	8,33	5,86	0,787		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	13	5,80	7,75	0,273		
	18:2 - K 6°C	13	5,25	7,78	0,094		
	18:3 - K 6°C	13	4,50	7,45	0,008		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	16:1 - K 17°C	13	7,50	1,00	0,000		
	18:1 - K 17°C	13	7,00	0,00	0,000		
	20:5 - K 17°C	13	7,50	1,00	0,000		
	18:2 - K 17°C	13	7,50	1,00	0,000		
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:3 - K 17°C	13	8,00	1,50	0,001		
	18:1 - 16:1	13	7,50	1,00	0,000		0,005
	20:5 - 16:1	13	7,17	5,00	0,002		0,022
	18:2 - 16:1	13	7,82	2,50	0,002		0,022
	18:3 - 16:1	13	8,50	2,00	0,003		0,024
	20:5 - 18:1	13	6,40	7,38	0,376	0,000	0,751
	18:2 - 18:1	13	5,33	7,50	0,040		0,199
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:3 - 18:1	13	7,00	7,00	0,005		0,028
	18:2 - 20:5	13	9,00	6,40	0,216		0,649
	18:3 - 20:5	13	7,00	7,00	0,094		0,377
	18:3 - 18:2	13	8,38	6,39	0,424		0,424

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

ANHANG

**Tabelle A6. TRT-30 min nach 168 h (progressive Motilität)**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	13	0,00	7,00	0,000		
	16:1 - K 6°C	13	0,00	7,00	0,000		
	18:1 - K 6°C	13	8,00	6,14	0,893		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	13	7,00	7,00	0,497		
	18:2 - K 6°C	13	5,50	7,67	0,110		
	18:3 - K 6°C	13	4,00	7,55	0,006		
	16:1 - K 17°C	13	7,00	0,00	0,000		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	18:1 - K 17°C	13	7,00	0,00	0,000		
	20:5 - K 17°C	13	7,50	1,00	0,000		
	18:2 - K 17°C	13	7,50	1,00	0,000		
	18:3 - K 17°C	13	7,50	1,00	0,000		
	18:1 - 16:1	13	7,50	1,00	0,000		0,005
	20:5 - 16:1	13	7,00	7,00	0,005		0,037
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:2 - 16:1	13	7,64	3,50	0,005		0,037
	18:3 - 16:1	13	7,70	4,67	0,027		0,160
	20:5 - 18:1	13	6,00	7,86	0,542	0,000	0,542
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:2 - 18:1	13	5,33	7,50	0,040		0,199
	18:3 - 18:1	13	3,00	7,73	0,003		0,031
	18:2 - 20:5	13	6,40	7,38	0,376		0,751
	18:3 - 20:5	13	6,33	7,20	0,068		0,272
	18:3 - 18:2	13	7,75	6,67	0,340		1,000

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

ANHANG

**Tabelle A7. TRT-300 min nach 168 h (Gesamtmotilität)**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	13	13,00	6,50	0,021		
	16:1 - K 6°C	13	13,00	6,50	0,021		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	18:1 - K 6°C	13	6,33	7,20	0,068		
	20:5 - K 6°C	13	6,00	7,30	0,057		
	18:2 - K 6°C	13	13,00	6,50	0,021		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	18:3 - K 6°C	13	4,60	8,50	0,127		
	16:1 - K 17°C	13	8,38	4,80	0,146		
	18:1 - K 17°C	13	8,22	4,25	0,048		
	20:5 - K 17°C	13	8,20	3,00	0,008		
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:2 - K 17°C	13	8,14	5,67	0,455		
	18:3 - K 17°C	13	7,44	6,00	0,146		
	18:1 - 16:1	13	7,75	5,80	0,273		
	20:5 - 16:1	13	9,25	3,40	0,048		
	18:2 - 16:1	13	6,83	7,14	0,787		
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:3 - 16:1	13	7,13	6,80	0,455	0,078	Post-Hoc dürfen nicht interpretiert werden
	20:5 - 18:1	13	7,25	6,60	0,414		
	18:2 - 18:1	13	7,00	7,00	0,094		
	18:3 - 18:1	13	8,75	6,22	0,497		
	18:2 - 20:5	13	8,00	6,82	0,038		
	18:3 - 20:5	13	8,33	6,60	0,168		
18:3 - 18:2	13	8,29	5,50	0,414			

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

ANHANG

**Tabelle A8. TRT-300 min nach 168 h (progressive Motilität)**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	13	13,00	6,50	0,021		
	16:1 - K 6°C	13	13,00	6,50	0,021		
	18:1 - K 6°C	13	4,75	8,00	0,068		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	13	6,33	7,20	0,068		
	18:2 - K 6°C	13	13,00	6,50	0,021		
	18:3 - K 6°C	13	5,25	7,78	0,094		
	16:1 - K 17°C	13	7,39	6,13	0,152		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	18:1 - K 17°C	13	8,11	4,50	0,057		
	20:5 - K 17°C	13	8,10	3,33	0,010		
	18:2 - K 17°C	13	7,57	6,33	0,635		
	18:3 - K 17°C	13	7,33	6,25	0,168		
	18:1 - 16:1	13	8,13	5,20	0,191		
	20:5 - 16:1	13	8,11	4,50	0,057		
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:2 - 16:1	13	7,20	6,88	0,542		
	18:3 - 16:1	13	7,57	6,33	0,635		
	20:5 - 18:1	13	6,63	7,60	0,635	0,082	Post-Hoc dürfen nicht interpretiert werden
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:2 - 18:1	13	4,75	8,00	0,068		
	18:3 - 18:1	13	6,00	7,63	0,305		
	18:2 - 20:5	13	7,50	6,91	0,033		
	18:3 - 20:5	13	6,67	7,10	0,080		
	18:3 - 18:2	13	8,29	5,50	0,414		

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

ANHANG

**Tabelle A9. Vitalitätstest Rh123 / PI nach 72h**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	16:1 - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	18:1 - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	16	8,25	8,58	0,072		
	18:2 - K 6°C	16	0,00	8,50	0,000		
	18:3 - K 6°C	16	4,00	9,14	0,001		
	16:1 - K 17°C	16	8,80	4,00	0,000		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	18:1 - K 17°C	16	9,83	4,50	0,008		
	20:5 - K 17°C	16	8,50	0,00	0,000		
	18:2 - K 17°C	16	8,87	3,00	0,000		
	18:3 - K 17°C	16	9,14	4,00	0,001		
	18:1 - 16:1	16	9,80	7,91	0,348		0,697
	20:5 - 16:1	16	9,00	1,00	0,000		0,001
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:2 - 16:1	16	8,46	8,67	0,028		0,140
	18:3 - 16:1	16	9,50	6,83	0,175		0,526
	20:5 - 18:1	16	9,00	1,00	0,000	0,000	0,001
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:2 - 18:1	16	8,64	7,50	0,004		0,025
	18:3 - 18:1	16	10,20	5,67	0,083		0,333
	18:2 - 20:5	16	0,00	8,50	0,000		0,000
	18:3 - 20:5	16	3,50	9,21	0,001		0,004
	18:3 - 18:2	16	8,86	8,22	0,782		0,782

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

ANHANG

**Tabelle A10. Akrosomaler Defekte nach 24 h**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	16	8,00	0,00	0,000		
	16:1 - K 6°C	16	7,96	12,25	0,022		
	18:1 - K 6°C	16	7,72	8,42	0,609		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	16	8,31	7,64	0,731		
	18:2 - K 6°C	16	7,69	7,25	0,593		
	18:3 - K 6°C	16	8,25	5,00	0,158		
	16:1 - K 17°C	16	6,42	9,06	0,230		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	18:1 - K 17°C	16	6,67	8,92	0,010		
	20:5 - K 17°C	16	6,33	8,42	0,018		
	18:2 - K 17°C	16	4,00	8,45	0,008		
	18:3 - K 17°C	16	5,83	8,54	0,012		
	18:1 - 16:1	16	7,20	8,40	0,184		
	20:5 - 16:1	16	6,90	9,23	0,082		
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:2 - 16:1	16	9,75	8,08	0,138		
	18:3 - 16:1	16	7,50	9,10	0,246		
	20:5 - 18:1	16	6,86	8,14	0,793	0,306*	Post-Hoc dürfen nicht interpretiert werden
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:2 - 18:1	16	8,86	8,22	0,770		
	18:3 - 18:1	16	8,40	8,67	0,424		
	18:2 - 20:5	16	7,21	7,79	0,911		
	18:3 - 20:5	16	8,64	6,36	0,637		
	18:3 - 18:2	16	9,61	7,07	0,353		

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

\* Monte-Carlo-Simulation

ANHANG

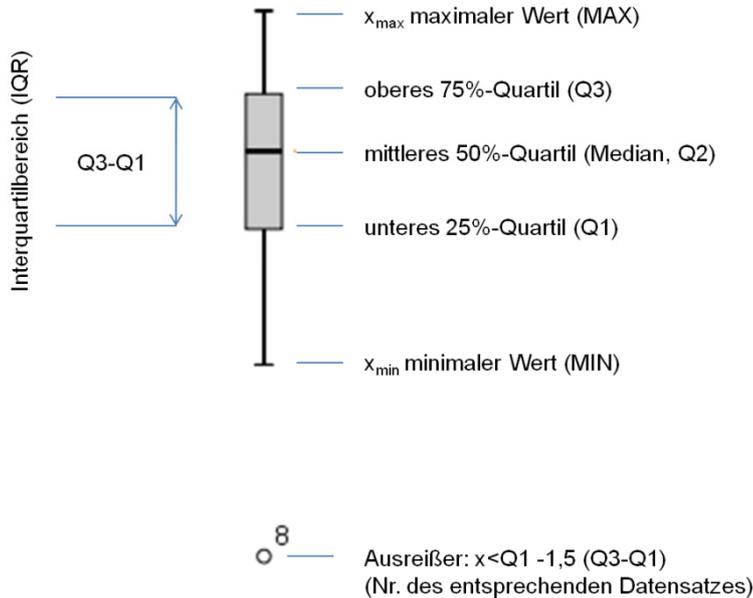
**Tabelle A11. Akrosomaler Defekte nach 72 h**

Vergleich/Test	Gruppenvergleich	N	negative Ränge	positive Ränge	Signifikanz Wilcoxon ohne Adjustierung	Signifikanz Friedman	Signifikanz Wilcoxon nach Bonferroni-Holm-Adjustierung
Test°1: Vergleich der beiden unbehandelten Kontrollproben bei 6°C und bei 17°C untereinander	K 17°C - K 6°C	16	8,54	8,25	0,005		
	16:1 - K 6°C	16	8,75	5,00	0,008		
	18:1 - K 6°C	16	8,95	7,50	0,119		
Test°3: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (6°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	20:5 - K 6°C	16	7,89	8,17	0,552		
	18:2 - K 6°C	16	8,10	9,17	0,519		
	18:3 - K 6°C	16	7,95	6,38	0,093		
	16:1 - K 17°C	16	8,50	7,23	0,094		
Test°2: paarweiser Vergleich der unbehandelten Kontrollproben (17°C) mit den jeweiligen Supplementierungsvarianten (6°C)	18:1 - K 17°C	16	5,88	8,77	0,037		
	20:5 - K 17°C	16	7,00	8,15	0,006		
	18:2 - K 17°C	16	4,83	8,23	0,014		
	18:3 - K 17°C	16	7,67	7,45	0,066		
	18:1 - 16:1	16	7,63	8,14	0,096		0,482
	20:5 - 16:1	16	8,25	8,54	0,005		0,053
Test°4: Vergleich der unterschiedlichen Supplementierungsvarianten untereinander	18:2 - 16:1	16	8,83	8,42	0,029		0,231
	18:3 - 16:1	16	6,40	8,11	0,209		0,834
	20:5 - 18:1	16	6,33	7,20	0,065	0,007*	0,455
Test°5: wenn im Test 4 $p \leq 0,05$ festgestellt wurde, dann wurde <i>a posteriori</i> Post-Hoc-Test durchgeführt	18:2 - 18:1	16	6,58	8,19	0,433		1,000
	18:3 - 18:1	16	9,70	7,15	0,532		1,000
	18:2 - 20:5	16	9,69	7,31	0,638		0,638
	18:3 - 20:5	16	10,23	4,70	0,019		0,171
	18:3 - 18:2	16	9,41	6,50	0,068		0,406

Als **Nullhypothese** wurde angenommen, dass die Proben sich in ihrem untersuchten physiologischen Status nicht unterscheiden. Als **Alternativhypothese** wurde definiert, dass die Proben Unterschiede in ihrem physiologischen Status aufweisen. Es wurde festgelegt, der Test liefert nur dann signifikante Unterschiede, wenn  $p \leq 0,05$ . Für hochsignifikante Unterschiede wurde  $p \leq 0,001$  festgelegt. Bei einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese galt als statistisch gesichert.

\* Monte-Carlo-Simulation

### 8.1.4 Darstellung eines Boxplot-Diagramms



**Abbildung 42: Aufbau eines Boxplot-Diagramms**

Die Ergebnisse sind als Boxplots mit dem höchsten ( $x_{\max}$ ) bzw. niedrigsten ( $x_{\min}$ ) gemessenen Wert (Whisker), dem Interquartilbereich zwischen dem 1. und 3. Quartil (Box) und dem Medianwert dargestellt. Die Box verläuft vom oberen 75%-Quartil (Q3) zum unteren 25%-Quartil (Q1). Das mittlere 50%-Quartil (Q2, Median) ist in der Box eingezeichnet. Die Box verläuft zwischen dem oberen (Q3) und dem unteren (Q1) Quartil und entspricht dem Interquartilbereich (IQR). Als Ausreißer werden die Werte, die das Q3 bzw. das Q1 um mehr als das 1,5-fache des IQR über- bzw. unterschreiten, klassifiziert (Quelle: <http://wikia.com/wiki/Box-Plot>). Der Faktor 1,5 zur Definierung der Ausreißer basiert auf der Annahme einer Normalverteilung der zugrunde liegenden Messwerte. Sie werden mit einem Kreis und der Nummer des entsprechenden Datensatzes gekennzeichnet. Bei dem in der Abbildung beispielhaft dargestellten Ausreißer entspricht die Nummer des Datensatzes dem Individuum 8. Ausführliche Information sind Krummenauer *et al.* (2007) zu entnehmen.

Die Klassifikation der Ausreißer ist sowohl von der Verteilung als auch von Streuung der Messwerte Interquartilbereichs abhängig (Chambers et al., 1983; Gather and Pawlitschko, 2006; Kuhnt and Pawlitschko, 2005).

### 8.1.5 Anzahl von zu erhebenden physiologischen Parametern

Tabelle 12: Stichprobengröße, Anzahl der zu erhebenden physiologischen Parametern

N	48 h		48 h		168 h		168 h		72 h	24 h	72 h
	TRT-30 MOT	TRT-300 MOT	TRT-30 PMOT	TRT-300 PMOT	TRT-30 MOT	TRT-300 MOT	TRT-30 PMOT	TRT-300 PMOT	Rh123/PI	Akrosom defekte	Akrosom defekte
<b>1</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>2</b>	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<b>3</b>	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
<b>4</b>	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
<b>5</b>	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
<b>6</b>	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
<b>7</b>	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
<b>8</b>	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
<b>9</b>	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
<b>10</b>	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
<b>11</b>	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
<b>12</b>	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
<b>13</b>	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143
<b>14</b>	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
<b>15</b>	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
<b>16</b>	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176

N: Stichprobengröße (Anzahl der zu untersuchenden Ejakulaten, fett gedruckt); 24 h, 48 h, 72 h, 168 h: Zeitpunkte der Untersuchung; Untersuchungen der physiologischen Parameter (grau unterlegt): TRT-30-MOT - Erfassung der gesamtmotilen *Spermatozoen* in TRT-30, TRT-300-MOT - Erfassung der gesamtmotilen *Spermatozoen* in TRT-300, TRT-30-PMOT - Erfassung der progressivmotilen *Spermatozoen* in TRT-30, TRT-300-PMOT - Erfassung der progressivmotilen *Spermatozoen* in TRT-300, Rh123/PI - Erfassung der vitalen *Spermatozoen*, Akrosomdefekte: Erfassung der akrosomdefekten *Spermatozoen*.

Anzahl der zu erhebenden physiologischen Parametern beträgt 176 je Inkubationsvariante (16 Individuen × 11 Untersuchungen). Die Untersuchung von zwei Kontrollproben (6°C und 17°C) und zusätzlich fünf Supplementierungsvarianten bei eine Stichprobengröße von N=16 ergibt somit 176 × 7 = 1232 zu ergebenden Datensätze.