

Massenspektrometrische Untersuchungen an Spermien-Phospholipidmembranen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Dipl.-Biol. Kristin Zschörnig, geborene Bresler
geboren am 16.05.1983 in Leipzig

angefertigt an der: Universität Leipzig – Medizinische Fakultät
Institut für Medizinische Physik und Biophysik

Betreuer: PD Dr. rer. nat. habil. Jürgen Schiller

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 23.09.2014

Bibliographische Beschreibung

Zschörnig, Kristin

Massenspektrometrische Untersuchungen an Spermien-Phospholipidmembranen

Universität Leipzig, Dissertation

83 S., 149 Lit., 22 Abb., 9 Tab.

Referat

Fettleibigkeit und Adipositas haben in den letzten Jahren weltweit drastisch zugenommen. Die Fettleibigkeit geht nicht nur mit einer verringerten Lebensqualität einher, sondern ist auch mit verschiedenen Folgeerkrankungen, wie kardiovaskulären Erkrankungen (z.B. Arteriosklerose) und metabolische Erkrankungen (z.B. Diabetes) assoziiert. Vorliegende Studien belegen einen Zusammenhang zwischen Diabetes und männlicher Infertilität. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Spermienmembran wie auch das Seminalplasma (SP) mittels matrix-assisted laser desorption and ionisation time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) analysiert, um mögliche Lipid-Biomarker für die Fertilität bzw. Infertilität zu finden. Dafür wurde zunächst die MALDI-TOF MS Methode mit relevanten Standardlipiden optimiert. Anschließend konnte sowohl das Phospholipidmuster des SP mit dem Spermien verglichen werden als auch die Spermienlipide von normalgewichtigen und fettleibigen Probanden. Durch diese Analyse konnte das Phosphatidylcholin/Lysophosphatidylcholin (PC/LPC)-Verhältnis, aber auch ein stark erhöhter Sphingomyelin (SM)-Anteil bei den fettleibigen Probanden als Qualitätsmarker gefunden werden. Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit murine Spermien aus dem Caput und dem Cauda der Epididymis mittels MALDI-TOF MS analysiert und das Phospholipidmuster miteinander verglichen. Es konnte damit gezeigt werden, dass die murinen Spermien einen wesentlich höheren Anteil an Stearinsäureresten aufweisen, die humanen Spermien hingegen vor allem durch Palmitinsäurereste charakterisiert sind. In den Spermienmembranen aus dem Cauda und dem Caput gab es wesentliche Unterschiede im Phospholipidmuster. Spermienmembranen aus dem Caput besitzen einen hohen Anteil an PC und Phosphatidylethanolamin (PE). Die Spermienmembranen aus dem Cauda hingegen enthalten mehr SM, und auch einen höheren Anteil an LPCs und Formyl-LPC. Diese Arbeit konnte somit zeigen, dass die Reifungsprozesse in der Epididymis auch die Phospholipid-Zusammensetzung betreffen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Fettleibigkeit und Infertilität	1
1.2	Spermien und Seminalplasma (SP).....	3
1.3	Humane und tierische Spermien	5
1.4	Spermatogenese und Epididymis	7
1.5	Membranen, Fettsäuren (FS) und Phospholipide (PL)	8
1.6	Phospholipase und oxidativer Stress.....	13
1.7	Lipidanalytik.....	15
1.7.1	MALDI-TOF MS	16
2	Aufgabenstellung	20
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Geräte, Materialien und Chemikalien	21
3.1.1	Geräte.....	21
3.1.2	Materialien und Chemikalien.....	21
3.2	Methoden.....	23
3.2.1	Eingesetzte Matrizes.....	23
3.2.2	Humane Spermienisolation	23
3.2.3	Artifizielle Veränderung der Phospholipidextrakte der Spermien	24
3.2.4	Murine Spermengewinnung aus der Epididymis	24
3.2.5	Lipidextraktion biologischer Proben	25
3.2.6	MALDI-TOF Massenspektrometrie	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Optimierung der MALDI-TOF MS Methode	27
4.2	Optimierung der Lipidextraktion verschiedener biologischer Proben.....	36
4.3	Optimierte Lagerung von isolierten Spermien und SP	39
4.4	Vergleich der Lipidzusammensetzung humaner Spermien von normalgewichtigen und übergewichtigen Spendern	44

4.5	Vergleich muriner epididymaler Spermien aus Cauda und Caput	48
5	Diskussion.....	54
5.1	Optimierung der MALDI-TOF MS Methodik für humane Spermien	55
5.2	Optimierung der Lipidextraktion verschiedener biologischer Proben.....	60
5.3	Optimierte Lagerungen von Spermien und SP	62
5.4	Vergleich der Lipidzusammensetzung humaner Spermien gesunder und fettleibiger Spender	64
5.5	Vergleich muriner epididymaler Spermien aus Cauda und Caput	67
6	Zusammenfassung	70
7	Literatur	72

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Morphologie eines Spermiums	3
Abb. 2: Aufbau einer Lipid-Doppelmembran	9
Abb. 3: Übersicht der in der Natur am häufigsten vorkommenden Lipide	9
Abb. 4: Entstehung von LPC aus PC	12
Abb. 5: Entstehung von ROS unter in vivo-Bedingungen.....	14
Abb. 6: Aufbau und schematisierte Funktionsweise eines MALDI-TOF MS.....	17
Abb. 7: Modifizierte "Bligh & Dyer"-Extraktion.....	25
Abb. 8: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren unterschiedlicher Proben mit variablen Verhältnissen zweier ausgewählter Lipide.....	28
Abb. 9: Positiv-Ionen Massenspektren in Abhängigkeit von der Laserintensität. ...	31
Abb. 10: Positiv-Ionen Massenspektren mit steigender Reflektorspannung.....	32
Abb. 11: Standardabweichung des massenspektrometrisch bestimmten PC/LPC-Verhältnisses unter Nutzung verschiedener Lösungsmittel.	33
Abb. 12: Positiv-Ionen Massenspektren von SP in Gegenwart ausgewählter Standardlipide.....	35
Abb. 13: Typische Probenröhrchen nach durchgeführter Lipidextraktion.	37
Abb. 14: Flußschema zur Lipidextraktion von Spermien, SP und Blutplasma.	38
Abb. 15: Positiv-Ionen Massenspektren humaner Spermienextrakte nach unterschiedlich langer Lagerung der Spermien bei RT.	40
Abb. 16: Positiv-Ionen Massenspektren von humanen Spermienextrakten nach unterschiedlichen Lagerungszeiten der Spermien im TK bei -20°C.....	41
Abb. 17: Positiv-Ionen Massenspektren humaner SP nach Lagerung über unterschiedliche Zeiten bei -20°C.	43
Abb. 18: Positiv-Ionen Massenspektren von Spermien- und SP-Extrakten eines normalgewichtigen Probanden.	45
Abb. 19: Positiv-Ionen Massenspektren humaner Spermien- bzw. SP-Extrakte eines adipösen Spenders.....	46
Abb. 20: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren der Lipidextrakte von aus muriner Epididymis isolierten Spermien.....	49
Abb. 21: Positiv-Ionen Massenspektren muriner Spermienextrakte der Epididymis unter Verwendung einer CsCl-gesättigten DHB-Matrix.....	51
Abb. 22 : Enzymatische und nichtenzymatische Generierung bzw. Anreicherung von LPC über ausgewählte Mechanismen.	63

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Gewichtsklassifikation mittels BMI	1
Tab. 2: Übersicht über Kopfgruppen der wichtigsten Glycerophospholipide.....	11
Tab. 3: Phospholipasen und ihre katalytischen Eigenschaften.....	13
Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel.....	21
Tab. 5: Übersicht über die eingesetzten Standard-Phospholipide	22
Tab. 6: Detektierte Lipide mit entsprechenden <i>m/z</i> -Werten.....	29
Tab. 7: Lipidausbeute (in %) in Spermienextrakten, die mit unterschiedlichen Extraktionsbedingungen gewonnen wurden	36
Tab 8: Klinische Parameter unterschiedlicher Probanden.	47
Tab. 9: Zuordnung der in den Caput und Cauda detektierten Phospholipide.	52

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

9-AA	9-Aminoacridin
AA	Arachidonsäure
ACN	Acetonitril
amu	atomic mass unit (atomare Masseneinheit)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Chemische Ionisation bei Athmosphärendruck)
BMI	Body mass index (Körper-Masse-Index)
DAG	Diacylglycerol
DHA	Docosahexaenoic acid (Docosahexaensäure)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPA	Docosapentaenoic acid (Docosapentaensäure)
e	Elementarladung
EBSS	Earls Balance Salt Solution
EI	Elektronenstossionisation
ESI	Elektrosprayionisation
FS	Fettsäure
g	Gravitationskonstante
GPL	Glycerophospholipid
isoProp	Isopropanol
KH	Kohlenhydrat
LPC	Lysophosphatidylcholin
LT	Leukotriene
M	Molar
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionisation (Matrixunterstützte Laserdesorption und Ionisierung)
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Mass-to-Charge Ratio (Masse-zu-Ladungs-Verhältnis)
nm	nanometer
PA	Phosphatidic acid (Phosphatidsäure)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Phosphatidylcholin

PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PG	Prostaglandin
PL	Phospholipid
PS	Phosphatidylserin
PLA ₂	Phospholipase A ₂
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
SL	Seminolipid
SM	Sphingomyelin
<i>sn</i>	stereo-specific numbering
SP	Seminalplasma
TAG	Triacylglycerol
Th	Thomson (Einheit des <i>m/z</i> -Verhältnisses)
TK	Tiefkühlschrank
TOF	time-of-flight (Flugzeit)
U	Beschleunigungsspannung
UV	ultraviolett
<i>v</i>	Geschwindigkeit
VLDL	very low density lipoprotein (Lipoprotein sehr geringer Dichte)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
w/w	weight/weight
<i>z</i>	Ladungszahl

1 Einleitung

1.1 Fettleibigkeit und Infertilität

In den letzten Jahrzehnten hat die Zahl der Übergewichtigen und Fettleibigen, insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, sehr stark zugenommen. Dieser Trend scheint auch weiterhin zuzunehmen. Zum einen aufgrund gesteigerten Nahrungsangebots, zum anderen durch eine veränderte, ungesündere Lebensweise. Überraschenderweise betrifft dies aber nicht nur die entwickelten Länder, sondern zunehmend auch Entwicklungs- und Schwellenländer (Popkin *et al.*, 1994). Dies konnte in vielen epidemiologischen Studien (James *et al.*, 2004; Sallmen *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007; Ramlau-Hansen *et al.*, 2007) gezeigt werden. Für die Berechnung der Gewichtsklassifikation verwendet man den Quetelet-Index oder auch BMI (Body-Mass-Index) genannt. Der BMI ist der Quotient aus Körpermasse und Körperlänge zum Quadrat:

$$\text{BMI} = \text{Körpermasse in kg} / \text{Körperlänge in (m)}^2$$

„Adipositas“ und „Übergewicht“ werden fälschlicherweise in vielen Publikationen als Synonyme verwendet. Von Übergewicht spricht man jedoch nur bei einem BMI zwischen 25,0 und 29,9. Adipositas ist durch eine überaus starke Vermehrung des Körperfettes gekennzeichnet (Hauner *et al.*, 2007) und beginnt mit einem BMI von 30,0. Die sich aus dem BMI bildenden Gewichtsklassifikationen sind in der folgenden Tab. 1 zu finden, wobei zu beachten ist, dass sich diese Angaben nur auf Erwachsene beziehen.

Tab. 1: Gewichtsklassifikation mittels BMI (nach WHO 2000)

Klassifikation	BMI
Normalgewichtig	18,5-24,9
Übergewichtig	25,0-29,9
Adipositas I	30,0-39,9
Adipositas II	≥40,0

Der BMI hat einen sehr großen Nachteil: Durch den BMI kann nicht zwischen Fettmasse und Muskelmasse differenziert werden, weshalb man nicht nur den BMI für eine Klassifikation heranziehen sollte (Wenzel *et al.*, 2003).

Die Fettleibigkeit beeinträchtigt nicht nur die Lebensqualität, sondern stellt ein erhöhtes Risiko für verschiedenste Folgeerkrankungen dar (Fabris *et al.*, 2006). Dabei hängt das Ausmaß dieser Erkrankungen von der Dauer und dem Ausmaß der Fettleibigkeit ab. Zu den Folgeerkrankungen gehören diverse Krebsarten, kardiovaskuläre Erkrankungen (Thompson *et al.*, 1999) wie Arteriosklerose, Einschränkungen des Bewegungsapparates, wie bei der Arthrose, aber auch metabolische Erkrankungen, wie Diabetes (Chan *et al.*, 1994). Diabetes steht unter anderen im engen Zusammenhang zu einer verringerten männlichen Fertilität. Die molekularen Mechanismen sind allerdings noch weitgehend unbekannt (Bacatti *et al.*, 2002; Seethalakshmi *et al.*, 1987). Auch Adipositas ohne Diabetes verringert die männliche Fertilität stark (Spandorfer *et al.*, 2004; Hammoud *et al.*, 2006; Pasquali *et al.*, 2007; Kort *et al.*, 2006). Die männliche Fettleibigkeit verringert zum einen die Spermienkonzentration (Finucane *et al.*, 2011; Paasch *et al.*, 2010) und zum anderen die Anzahl der motilen Spermien (Hammoud *et al.*, 2008). Sie verändert aber auch die Spermienmorphologie und erhöht DNA-Fragmentierungen (Kort *et al.*, 2006).

Fettleibigkeit ist ein Zustand, der systemischen oxidativen Stress auslöst (Ozata *et al.*, 2002; Furukawa *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2007). Beim oxidativen Stress sind die ROS (reaktive Sauerstoffspezies) in zu hoher Konzentration vorhanden bzw. werden im Übermaß gebildet (die stationäre ROS-Konzentration ist aufgrund ihrer hohen Reaktivität nahezu Null). Diese führen zu Oxidationen von Proteinen aber auch Lipiden (Lipidperoxidation). Daher können ROS in zu hohen Konzentrationen extrem toxisch auf z.B. menschliche Spermien wirken (Jones *et al.*, 1979) und somit auch eine signifikante Rolle bei männlicher Infertilität spielen (Kasturi *et al.*, 2008). Man geht davon aus, dass der oxidative Stress den größten Einfluss auf die Spermienqualität hat (Tunc *et al.*, 2011). ROS sind allerdings auch bei gesunden Männern in geringen Konzentrationen im Ejakulat vorhanden bzw. werden dort *in situ* generiert. Zum einen werden diese durch Leukozyten gebildet (De Lamirande *et al.*, 1995), zum anderen in geringen Mengen von den Spermien selbst (Aitken *et al.*, 1992, 1997): In geringen Mengen wirken ROS nämlich als physiologische Transmitter. ROS haben wichtige Funktionen bei der Kapazitation und akrosomalen Reaktion (Ochsendorf *et al.*, 1999). Eine unphysiologisch hohe Konzentration führt jedoch u.a. zur Oxidation der Membranlipide und stört somit die Membranfunktionen. Auch steht eine erhöhte DNA-Oxidation in Zusammenhang mit der Infertilität (Aitken *et al.*, 1989; Kort *et al.*, 2006; Chavarro *et al.*, 2010).

1.2 Spermien und Seminalplasma (SP)

Bei einem Spermium (Spermatozoon) handelt es sich um eine motile männliche Keimzelle, die für die Befruchtung der weiblichen Eizelle und somit für die Entstehung neuen Lebens unabdingbar ist. Das Spermium, eine hochdifferenzierte Zelle, ist etwa 55-60 μm lang und besteht im Wesentlichen aus drei Bestandteilen, dem Kopf, Mittelstück/Hals und dem Schwanz. Diese typische morphologische Gestalt ist in Abb. 1 zu sehen.

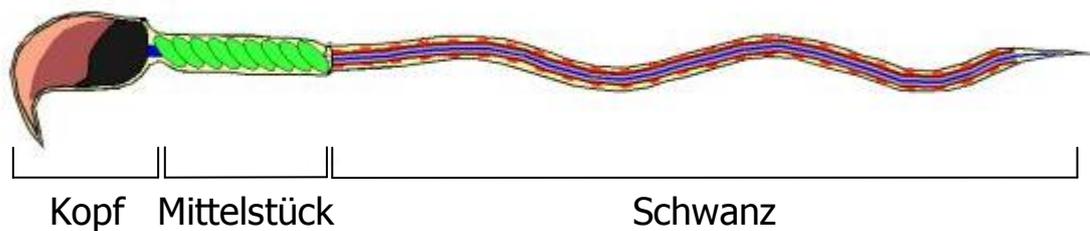


Abb. 1: Morphologie eines Spermiums (Bild nach Buffon *et al.*, 2012)

Der Kopf beinhaltet vor allem das haploide genetische Material und das kappenartige Akrosom. Dieses überzieht den gesamten Kopf des Spermiums unterhalb der Zellmembran (Rüsse *et al.*, 1998). Die im Akrosom enthaltenen lytischen Enzyme werden bei der Akrosomenreaktion freigesetzt und leiten somit den Befruchtungsvorgang ein (Abou-Haila *et al.*, 2009). Der Halsbereich bzw. das Mittelstück sind die Verbindung zwischen Kopf und Schwanz und enthalten eine spiralförmig angeordnete Schicht von Mitochondrien. Die Mitochondrien liefern die nötige Energie für die Fortbewegung der Spermien bis zur weiblichen Eizelle. Die Fortbewegung der Spermien wird durch den beweglichen Schwanz gewährleistet. In den Spermien der Säugetiere sind verschiedene Membranen vorzufinden: Plasmamembran, Kernmembran, Akrosomenmembran und die Membran der Mitochondrien. Die Spermienmembranen spielen eine wichtige Rolle bei der Kapazitation und der Fertilisation. Es ist außerdem bekannt, dass die Akrosomenreaktion und die Fusion der Spermien mit der Eizelle im engen Zusammenhang mit der Zusammensetzung der Membran stehen (Zalata *et al.*, 1998).

Die Membranen bestehen aus verschiedensten Phospholipiden, Glykolipiden und Sterolen (Parks *et al.*, 1992; Minassian *et al.*, 1966). Bewiesen wurde unter anderen die Anwesenheit von Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SM),

Seminolipid (SL) und Phosphatidylcholin (PC) in den humanen Spermien. Für eine erfolgreiche Fortpflanzung befinden sich die Spermien eingebettet im Seminalplasma (Samenplasma), wobei die Gesamtheit von Spermien und Seminalplasma das männliche Ejakulat ausmachen. Das Ejakulat setzt sich neben den Spermien und Seminalplasma auch aus unreifen Samenzellen, Epithelzellen und Leukozyten zusammen (Schülke *et al.*, 1982).

Seminalplasma ist ein von mehreren Drüsen abgegebenes Sekret des männlichen Geschlechtstraktes. Diese Drüsen nennt man akzessorische Drüsen, wozu die Samenleiterampulle, Samenblasendrüse und Vorsteherdrüse gehören. Zum geringen Anteil entsteht das SP auch in den Hoden und Nebenhoden. Das SP scheint eine wesentliche Rolle bei der Reifung der Spermien zu spielen (Mann *et al.*, 1978) und ist gleichzeitig ein wichtiges Transportmedium. SP ist ein komplexes Gemisch aus verschiedensten Bestandteilen (wie Zucker, Ascorbinsäure, Cholesterol, Phospholipide, Proteasen, Phosphate, Prostaglandine, Lymphozyten und verschiedene andere Bestandteile) (Gupta *et al.*, 2011) und variiert sehr stark zwischen verschiedenen Spezies bzw. Tierarten (Mortarino *et al.*, 1998; Villemure *et al.*, 2003). Unter den menschlichen Individuen gibt es auch gravierende Unterschiede sowohl hinsichtlich der Fertilität wie auch der Zusammensetzung (Strezezek *et al.*, 2005).

Die Bildung der Spermien nennt man Spermiogenese. Diese Reifung über diverse Entwicklungszustände ist noch nicht bis ins Detail verstanden. Die humane Spermiogenese, die etwa 64 Tage dauert, findet in den Samenkanälen der Hoden und zuletzt in den Nebenhoden statt. Es erfolgt ein ständiger Umbau der Bestandteile der Spermien, einschließlich ihrer Membranen (Yanagimachi *et al.*, 1994). Auch die Fähigkeit zur gerichteten Bewegung wird in dieser Phase erworben (Cooper *et al.*, 1996): Die Spermatogenese wird im Abschnitt 1.4 genauer beschrieben.

1.3 Humane und tierische Spermien

Humane Spermien

Das menschliche Ejakulat ist sehr heterogen, wobei jede einzelne Probe auch aus verschiedenen Subpopulationen mit verschiedenen biochemischen und physiologischen Eigenschaften besteht (Holt *et al.*, 2004). Die Membranlipide der Spermien und deren Zusammensetzung wurden bislang vor allem an tierischen Proben analysiert, beispielsweise an Spermien des Hausschweins (Leßig *et al.*, 2004), des Bullen (Schiller *et al.*, 2003), der Rinder (Schiller *et al.*, 2003) und natürlich auch des Menschen (Leßig *et al.*, 2004).

Die Membranlipide sind entscheidend für die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Zellen, so z.B. die Viabilität, Reifung und die Funktion der Spermien (Sebastian *et al.*, 1987).

Die Phospholipid-Zusammensetzung der humanen Spermienmembran ist sehr komplex und umfasst neben dem Seminolipid (SL) (Leßig *et al.*, 2004, 2005; Teuber *et al.*, 2011) auch große Mengen an Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE). Die Fettsäurezusammensetzung ist relativ einheitlich und umfasst große Mengen an hoch ungesättigten Acyl-Fettsäureresten, besonders Docosahexaensäure (22:6) (Mann *et al.*, 1981). Diese sind entscheidend für die Fluidität der Membranen sowie die Spermienmotilität und dementsprechend auch für den erfolgreichen Befruchtungsprozess (Müller *et al.*, 1999). Detaillierter bedeutet dies, dass PC (16:0/22:6) das am häufigsten vorkommende Glycerophospholipid (GPL) in den Spermien ist und fast die Hälfte der PC-Spezies ausmacht (Leßig *et al.*, 2004). Ein anderes wichtiges Lipid ist das Sphingomyelin (SM). Dieses Phospholipid ist in der Regel gesättigt, wobei SM 16:0 das am häufigsten vorkommende SM ist (Schiller *et al.*, 2000). SM und die daraus entstehenden Ceramide (Hydrolyse-Produkte von SM) sind wichtig beim Prozess der Kapazitation und der Akrosomenreaktion (Zanetti *et al.*, 2010). Der beträchtliche Gehalt an hoch ungesättigten Fettsäureresten und die geringe Aktivität von antioxidativen Enzymen im Zytoplasma (Agarwal *et al.*, 2004; Saleh *et al.*, 2002) sind der Grund dafür, dass Spermien sehr empfindlich gegenüber Oxidationsprozessen sind (De Lamirande *et al.*, 1997). Dies ist besonders bei Entzündungsprozessen ein Problem, da es dabei zu einer gesteigerten Produktion von ROS ("reaktive oxygen species") kommt (Fuchs *et al.*, 2012). Während des Fertilisationsprozesses erfolgt eine Veränderung der

PL-Zusammensetzung, bei der vor allem ein PC-abgeleitetes Produkt, das Lysophosphatidylcholin (LPC) (Fuchs *et al.*, 2012), entsteht. LPC besitzt nur noch einen Fettsäurerest (in aller Regel in der *sn*-1 Position), während die Hydroxylgruppe in *sn*-2 Position nicht verestert ist. LPC ist auch ein Detergenz, welches Strukturen der biologischen Membranen zerstört (Fuchs *et al.*, 2012). Allerdings ist die Bildung von LPC in einer moderaten Menge wichtig für die Akrosomenreaktion (De Lamirande *et al.*, 1998). Trotz allem ist die LPC-Konzentration in intakten Spermien sehr klein, da es ständig zu PC reacyliert wird. Weitere Details zu LPC werden in einem späteren Abschnitt dargelegt.

Tierische Spermien

Parallel zu den humanen Spermien werden auch tierische Spermien mit großem Interesse untersucht. Diese besitzen eine sehr große Relevanz hinsichtlich der künstlichen Befruchtung, die bei der Tierproduktion eine extrem wichtige Rolle spielt. Tierische Spermien können im Gegensatz zu den humanen als leicht verfügbare und einfache Modellsysteme (vor allem die Spermien von Bullen und Ebern sind relativ einfach zusammengesetzt) herangezogen werden. Manche Spermien (besonders von Wiederkäuern) sind charakterisiert durch eine große Menge an Alkenyl-Ether-Phospholipiden (bekannt als Plasmalogene, besonders das 1-O-alkenyl-2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin und -ethanolamin) (Fuchs *et al.*, 2009). In diesen Spermien sind die gesättigten Reste als Alkenyl-Ether gebunden, während es sich bei den Lipiden der humanen Spermien hauptsächlich um Acyl-Lipide, also Ester handelt (Lenzi *et al.*, 1996). Die Fettsäurezusammensetzung ist relativ einheitlich und umfasst große Mengen an hochungesättigten Fettsäureresten, besonders DHA (Docosahexaensäure, 22:6) und DPA 22:5 (Docosapentaensäure, 22:5) (Mann *et al.*, 1981) an der *sn*-2 Position der Phospholipide. Aufgrund der hochungesättigten Fettsäurereste sind die Spermien sehr empfindlich gegenüber Oxidationen. Insbesondere Plasmalogene werden als wichtige Antioxidantien diskutiert, da sie höhere Reaktivitäten mit ROS zeigen als konventionelle Diacyl-Lipide (Leßig *et al.*, 2009).

1.4 Spermatogenese und Epididymis

Das primäre männliche Geschlechtsorgan besteht aus dem Hoden (Testis) und Nebenhoden (Epididymis). Im Hoden werden die Spermien und Geschlechtshormone gebildet. Die Reifung und Lagerung der Spermien findet hingegen in den Nebenhoden statt. Hoden und Nebenhoden sind durch *Ductuli efferentes* verbunden, durch die sich die Spermatozyten bewegen und zahlreiche Moleküle, wie Proteine, transportiert werden können (Cooper *et al.*, 1996; Ilio *et al.*, 1994). Die Epididymis wird in Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda) unterteilt, in der die Spermien diverse Reifungsprozesse durchlaufen. Es erfolgen Umbauprozesse am Nukleus, an den Oberflächenproteinen aber auch an den Membranlipiden.

Die Spermatogenese ist ein kontinuierlich ablaufender Vorgang. Dieser umfasst die Entwicklung von primären Keimzellen bis hin zu den reifen Samenzellen (Leblond *et al.*, 1952) und kann in drei Phasen unterteilt werden (Russell *et al.*, 1990):

1. Mitotische Proliferation und Differenzierung von Spermatogonien (Stammzellen) (Monesi, 1962)
2. Meiotische Teilung von Spermatozyten
3. Reifung und Differenzierung zu den reifen Spermien (Russell *et al.*, 1990)

Die Spermatogenese findet in den Samenkanälen der Hoden statt. Die Spermatogonien befinden sich dabei an der Tubuswand. Die Keimzellen wandern dann während der Reifung ins Lumen. Diese Wanderung wird durch Hormone und komplexe Wechselwirkungen reguliert (Steinberger *et al.*, 1971; Russell *et al.*, 1977). Die Spermien gelangen dann über den *Ductuli efferentes* in den Nebenhoden, wo weitere Reifungsprozesse ablaufen. Beispielsweise verändert sich in der Epididymis die Spermienmembran beträchtlich, da Proteine und Lipide eingebaut und ausgebaut oder modifiziert werden (Cooper *et al.*, 1998; Kirchhoff *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Auch erwerben die Spermien erst bei der Reifung die Fähigkeit der gerichteten Bewegung (Cooper *et al.*, 1996). Die ausgereiften Spermien verbleiben bis zur Ejakulation im Nebenhoden. Der gesamte Prozess der Spermatogenese ist von speziesspezifischer, konstanter Dauer, die bei Mäusen etwa 35 Tage, beim Menschen jedoch ca. 64 Tage umfasst.

1.5 Membranen, Fettsäuren (FS) und Phospholipide (PL)

Zelluläre Membranen bilden die Trennschicht zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Milieu und sind wichtig für den Transport gelöster Stoffe. Sie sind auch wichtig für die Abgrenzung unterschiedlicher Bereiche in den Zellen. Ein Beispiel dafür ist der Transport von Nährstoffen aber auch von Ionen, die für die Signalübertragung (Ruhe- bzw. Erregungspotential) notwendig sind. Des Weiteren sind die Membranen auch an direkten Informationsübertragungen beteiligt, beispielsweise als Reaktion auf die Umwelt Speicherstoffe freizusetzen oder sogar den "programmierten Zelltod" (Apoptose) zu vollziehen. Dem Grundverständnis über den zellulären Aufbau von Membranen dient seit langem das sogenannte Fluid-Mosaik-Modell (Singer *et al.*, 1972). Dieses Modell impliziert, dass Membranen im Wesentlichen aus einer fluiden Lipid-Doppelschicht bestehen, die die Lipide aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften ausbilden. Die Membranlipide können sich innerhalb einer Schicht bewegen. Eine Flip-Flop-Bewegung, also das Wandern von der einen in die andere Einzelschicht (z.B. von der äußeren in die innere Membran), ist die Ausnahme. Neben den Lipiden sind auch Proteine und Kohlenhydrate (KH) in einer Membran zu finden. Je nach dem mit welchen anderen Komponenten (Proteine oder Kohlenhydrate) die KH verbunden sind, spricht man von Glykoproteinen oder Glykolipiden. Die Proteine sind entweder integral oder peripher in die Membran eingelagert und haben weniger eine stabilisierende Funktion, sondern sind vielmehr für die aktiven Prozesse verantwortlich. Derartige Membranproteine stehen u. a. auch im Zentrum der gegenwärtigen pharmakologischen Forschung (Philip *et al.*, 1989). Der Aufbau einer solchen typischen Doppelmembran ist in der folgenden Abb. 2 dargestellt.

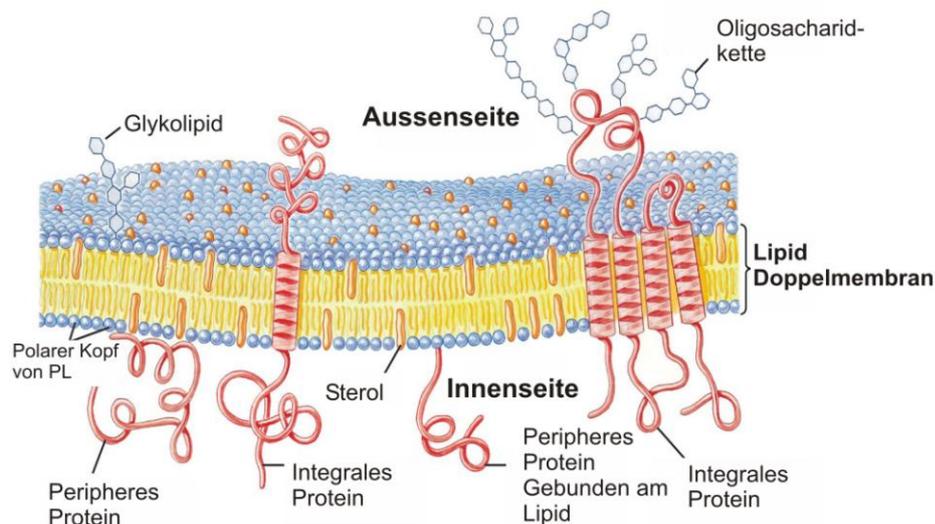


Abb. 2: Aufbau einer Lipid-Doppelmembran

Lipide können in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden, so z.B. in Fettsäuren, Triacylglyceride, Wachse, Phospholipide, Sphingomyeline, Isoprenoide und Lipopolysacharide. Einen Überblick darüber findet man in Abb. 3:

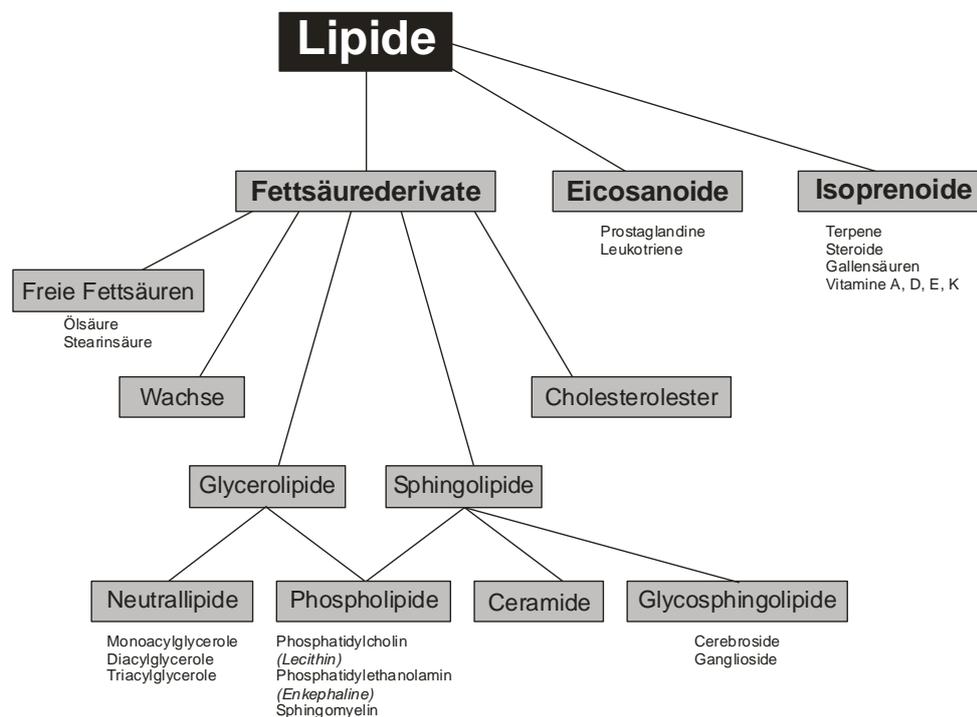


Abb. 3: Übersicht der in der Natur am häufigsten vorkommenden Lipide (Schiller et al., 2004)

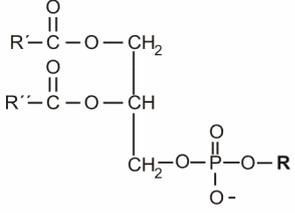
Fettsäuren sind meist unverzweigte Monocarbonsäuren, die aus einer Carboxylgruppe und einer Kohlenstoffkette mit variabler Länge bestehen. Die Carboxylgruppe ist der hydrophile und die Kohlenstoffwasserkerne der hydrophobe

Teil. Fettsäuren unterscheiden sich in der Kettenlänge und in der Anzahl bzw. in der Position der Doppelbindungen. Die Kettenlänge ist entscheidend für die Löslichkeit. Je kürzer die Kette ist, umso mehr dominiert der Einfluss der Carboxylgruppe und desto besser ist die Fettsäure in Wasser löslich. Die Anzahl der vorhandenen Doppelbindungen beeinflusst den Schmelzpunkt und damit die Fluidität. Dabei unterscheidet man gesättigte Fettsäuren, wie Palmitinsäure und Stearinsäure. Daneben gibt es auch die ungesättigten Fettsäuren, die eine viel wichtigere physiologische Rolle spielen. Zu den einfach ungesättigten Fettsäuren gehört unter anderen die Ölsäure und zu den mehrfach (zweifach) ungesättigten Fettsäuren die Linolsäure. Ein Charakteristikum der Spermien ist die Gegenwart von hochungesättigten Fettsäure(Resten) wie z.B. Docosahexaensäure (22:6), die 6 Doppelbindungen auf 22 Kohlenstoffatomen aufweist.

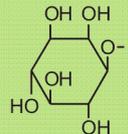
Generell sind die Lipide der Doppelmembran überwiegend durch die amphiphilen Phospholipide (PL), genauer Glycerophospholipide und Sphingolipide vertreten (Stryer *et al.*, 1987). Diese machen im gesamten Organismus zwar nur einen kleinen Teil im Vergleich zu den Triacylglycerolen aus, haben aber eine immense Bedeutung (Stryer *et al.*, 1987). PL sind nicht nur Membranbestandteile, sondern auch (z.B. Phosphatidsäuren, phosphorylierte Phosphoinositide) wichtige "second messenger" bei der Signaltransduktion (Fernandis *et al.*, 2007; Coffey *et al.*, 1998). Wie der Name Phospholipid verrät, besitzen diese phosphorhaltigen Lipide einen hydrophilen Kopf mit (in der Regel zwei) lipophilen Kohlenwasserstoffschwänzen. An den Phosphatidyl-Rest, bestehend aus einem Glycerin und einem Phosphat, sind zwei Fettsäurereste als Ester gebunden, die den lipophilen Schwanz der PL bilden.

Die Phospholipide sind weiterhin einteilbar in die neutralen (zwitterionischen) PL, wie z.B. Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) sowie die sauren Phospholipide, zu denen Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylinositol (PI) zählen (Fuchs *et al.*, 2008). Einen schematischen Überblick über diese Phospholipide und die Strukturen ihrer Kopfgruppen kann man der nachfolgenden Tabelle entnehmen.

Tab. 2: Übersicht von Kopfgruppen der wichtigsten Glycerophospholipide (Schiller *et al.*, 2004)



R = Kopfgruppe des PL
R', R'' = Verschiedene Fettsäurereste

Rest -R	Klasse	Rest -R	Klasse
-H	Phosphatidsäure (PA)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Phosphatidylserin (PS)
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Phosphatidylethanolamin (PE)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Phosphatidylglycerol (PG)
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Phosphatidylcholin (PC)		Phosphatidylinositol (PI)

Die Lipidzusammensetzung kann in Abhängigkeit von Zellart und Gewebe sehr stark variieren; allerdings dominieren in den meisten tierischen Geweben die Phosphatidylcholine (Stryer *et al.*, 1987). PC, PS, PI, PE und Sphingomyelin (SM) sind vor allem wichtige Bestandteile zellulärer Membranen (Stryer *et al.*, 1988). PS und PE sind an der inneren Membran lokalisiert, während SM und PC eher an der Außenseite zu finden sind (Yamaji-Hasegawa *et al.*, 2006). Hingegen spielen Diacylglycerole (DAG) und PA eine wichtige Rolle bei Prozessen der Signaltransduktion (Hodgkin *et al.*, 1998), obwohl sie nur in geringen Mengen vorkommen. Hochungesättigte Fettsäurereste, wie die Arachidonsäure (AA) sind wichtig für die Synthese essentieller Moleküle wie Prostaglandine (PG) und Leukotriene (LT) (Schiller *et al.*, 1999). In den folgenden Abschnitten wird noch etwas detaillierter auf die einzelnen Phospholipide und insbesondere jene, die in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind, eingegangen.

Phosphatidylcholin

Phosphatidylcholin (PC) oder auch Lecithin genannt, ist die Hauptkomponente aller biologischen Membranen. Das PC kommt bei den Säugetieren in großen Mengen vor und repräsentiert etwa 50-60% aller PL. Die höchsten Konzentrationen liegen in Leber, Gehirn, Herz, Lunge und Muskel vor (Zeisel *et al.*, 1993). Phosphatidylcholin ist ein wichtiger Membranbestandteil (Henry *et al.*, 1998; Exton *et al.*, 1997). Des Weiteren ist PC sehr wichtig für die Sekretion von Lipoproteinen wie z.B. VLDL (Yao *et al.*, 1989). Nicht zuletzt ist auch eine Beteiligung an der Cholesterin-Homöostase nachgewiesen (LeBlanc *et al.*, 1998). Phosphatidylcholin besteht aus einem

Glycerinrückgrat, welches mit zwei langkettigen FS verestert ist. Eine Phosphatgruppe befindet sich an der dritten, endständigen Hydroxylgruppe. Dieser bildet mit dem Cholin (einwertiger Alkohol) einen Phosphorsäurediester. Die PCs sind sowohl in humanen als auch tierischen Membranen enthalten und eignen sich daher besonders gut für speziesunabhängige Untersuchungen (z.B. den Vergleich humaner und muriner Proben), was bei Proteinen bzw. den entsprechenden Antikörpern nicht möglich ist.

Lysophosphatidylcholin

Lysophosphatidylcholin (LPC) besitzt als Grundgerüst ein Glycerin. Das Glycerin ist am ersten Kohlenstoffatom über eine Phosphatgruppe mit dem Cholin verbunden, wohingegen am zweiten Kohlenstoffatom eine Hydroxygruppe vorliegt. Das dritte Kohlenstoffatom ist mit einer Fettsäure verestert. Alternativ kann ein LPC auch als ein PC verstanden werden, das (z.B. unter Einfluss des Enzyms Phospholipase A₂) den Fettsäurerest in *sn*-2 Position verloren hat. Lysophosphatidylcholone erfreuen sich gegenwärtig großer Aufmerksamkeit als potentielle Krankheitsmarker. Der LPC-Gehalt in den zellulären Membranen liegt in der Regel bei unter 3%, wohingegen sie im Blutplasma bis zu 12% ausmachen (Munder *et al.*, 1973). Sie stellen natürliche Tenside dar und sind daher nur in sehr kleinen Konzentrationen in den Membranen vorhanden, da sie den supramolekularen Aufbau der Membranen stören würden. LPC können entweder enzymatisch durch die Anwesenheit von PLA₂ oder durch Einwirken von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus PC hervorgehen.

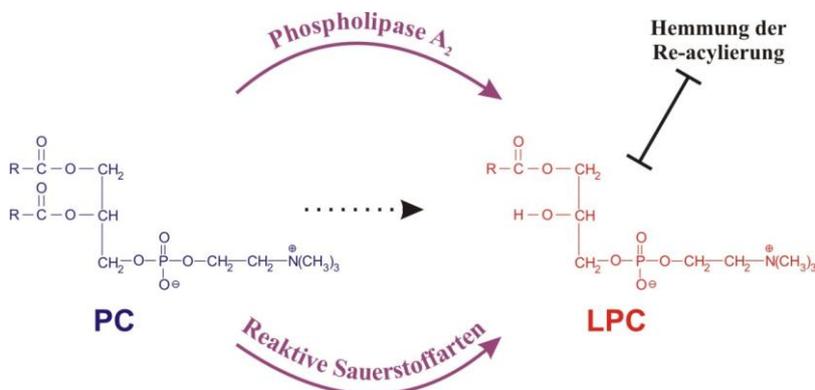


Abb. 4: Entstehung von LPC aus PC

Umwandlung von PC zu LPC durch die enzymatische Aktivität von PLA₂ bzw. durch Reaktion des PC mit ROS.

Die enzymatische Bildung ist wahrscheinlich der wichtigste Mechanismus für die LPC-Bildung (Roldan *et al.*, 2007). Andererseits kann LPC auch nur unter Einfluss von ROS ohne Aktivitäten von Phospholipasen entstehen (Fuchs *et al.*, 2012; Arnhold *et al.*, 2002). Dies bedeutet, dass LPC ein bioaktives, proinflammatorisches Lipid ist, welches vor allem unter pathologischen Bedingungen (erhöhte Aktivitäten von Phospholipasen, verstärkte Generierung von ROS) erzeugt wird (Matsumoto *et al.*, 2007). Somit stellt LPC einen sehr wichtigen Lipidmediator bei der Antwort auf Entzündungen dar (Lands *et al.*, 1968; Jackson *et al.*, 2008). Es gibt einen starken Effekt von LPC auf kultivierten Zellen. So konnte gezeigt werden, dass LPC einen Einfluss auf immunregulatorische Zellen (wie z.B. Makrophagen) hat und somit Entzündungen und Immunantworten beeinflusst. LPC spielt somit eine signifikante Rolle bei entzündlichen Krankheiten wie Arteriosklerose und/oder Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (Matsumoto *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2005).

1.6 Phospholipase und oxidativer Stress

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, können die Lyso-Verbindungen auf zwei Wegen entstehen. Zum einen enzymatisch durch Phospholipasen. Die Phospholipasen (Phosphatidasen) stellen eine sehr große Gruppe von Enzymen dar, die in besonders hoher Konzentration im Pankreas und in der Leber vorkommen. Entsprechend ihrer katalytischen Spezifität (d.h. der Position, wo sie die Phospholipidmoleküle spalten), werden die Phospholipasen in verschiedene Gruppen unterteilt (Phospholipase A-D) (Dennis *et al.*, 2000). Die verschiedenen, bekannten Phospholipasen sind mit ihren katalytischen Eigenschaften in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 3: Phospholipasen und ihre katalytischen Eigenschaften

Enzym	Katalyse
Phospholipase A ₁	Entfernt Fettsäuren von C ₁ des Glycerins
Phospholipase A ₂	Entfernt (in der Regel) ungesättigte Fettsäuren am C ₂ -Atom
Phospholipase C	Führt zur Bildung von Diacylglycerolen
Phospholipase D	Führt zur Bildung von Phosphatidsäuren

Bei der Entstehung von LPC aus PC spielt vor allem die Phospholipase A₂ (PLA₂) eine entscheidende Rolle. PLA₂ ist ein Enzym, das spezifisch den Fettsäurerest an der *sn*-2 Position in Phospholipiden spaltet. Es wird eine zytosolische, sekretorische, calciumunabhängige und eine Lipoprotein-assoziierte Form des Enzyms unterschieden (Natarajan *et al.*, 2004). Des Weiteren sind noch verschiedene Isoformen zu differenzieren. Die Hauptfunktion von PLA₂ ist die Regulation des Phospholipidmetabolismus, Aktivierung bzw. Deaktivierung von Entzündungsreaktionen und die Signaltransduktion (Dennis *et al.*, 2000).

Der zweite Weg, durch den LPC entstehen kann, ist durch oxidativen Stress bzw. über die Generierung von "reactive oxygen species" (ROS) (Fuchs *et al.*, 2012; Arnhold *et al.*, 2002). Beispielsweise können bei Entzündungsreaktionen durch Phagozyten hochreaktive Sauerstoffradikale generiert werden (respiratory burst) (Iles *et al.*, 2002).

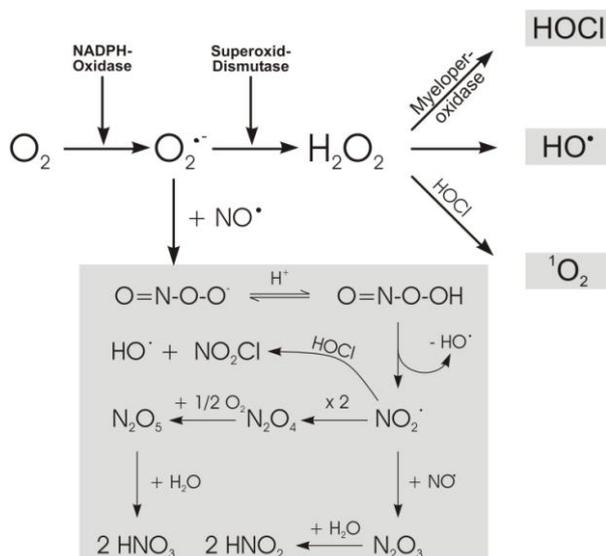


Abb. 5: Entstehung von ROS (reaktive Sauerstoffspezies) unter *in vivo*-Bedingungen

Werden reaktive Sauerstoffspezies im Übermaß gebildet, so spricht man von oxidativem Stress (Sies *et al.*, 1991). ROS sind aktivierte Formen des Sauerstoffs, wozu beispielsweise das Superoxidanionradikal, das Wasserstoffperoxid oder auch Hydroxylradikale gehören. Vor allem Letztere sind hochreaktiv und können zur Zerstörung biologischer Strukturen beitragen. Es konnte in den letzten Jahren an unterschiedlichsten Systemen gezeigt werden, dass auch PL-Oxidationen bei der Entstehung vieler Krankheiten involviert sind. Unter anderem bei der Arteriosklerose (Victor *et al.*, 2009), Asthma (Olopade *et al.*, 1997) oder auch der Parkinson-Krankheit (Mattson *et al.*, 2009) konnten ROS-induzierte

Oxidationsprodukte nachgewiesen werden. ROS haben auch zweifellos einen negativen Einfluss auf die Funktionen der Spermien und ihre Befruchtungsfähigkeit (Leßig *et al.*, 2005).

1.7 Lipidanalytik

In den letzten Jahren gab es ein gesteigertes Interesse an den Lipiden, wodurch sich der Begriff "Lipidomics" (Wenk *et al.*, 2005) etablierte, was die Detektion aller in einer Probe enthaltenen Lipide beinhaltet. Aufgrund dieses gestiegenen Interesses entwickelten sich parallel Methoden für eine immer bessere Lipidanalyse, worunter chromatographische (Fuchs *et al.*, 2011), massenspektrometrische (Murphy *et al.*, 2011), aber auch spektroskopische Verfahren wie z.B. die NMR-Spektroskopie fallen (Scheidt *et al.*, 2008). Wegen der sehr hohen Sensitivität der Massenspektrometrie (MS), scheint die MS die beste Methode für die Lipidanalyse von biologischen Proben zu sein und soll in der vorliegenden Arbeit auch hauptsächlich Anwendung finden. Die Analysesubstanz kann in der Ionenquelle auf verschiedensten Wegen ionisiert werden. Bei der Elektronenstossionisation (EI) erfolgt die Ionisation durch Stöße mit Elektronen, wobei zum überwiegenden Teil Radikalkationen entstehen. Dieses Verfahren ist nur sehr eingeschränkt für die Analytik von Lipiden geeignet, da (a) PL keine ausreichend hohe Flüchtigkeit besitzen und (b) die EI-MS stark zur Bildung von Bruchstücken neigt. Um dieses Problem zu reduzieren wurden in den letzten Jahren "Soft-Ionisation" Methoden etabliert, die zu keiner oder nur sehr geringfügiger Fragmentierung der Lipidmoleküle führen. Dazu gehört unter anderem ESI (Elektrospray-Ionisation) (Pulfer *et al.*, 2003), APCI (chemische Ionisation bei Atmosphärendruck) und MALDI-MS (Schiller *et al.*, 2007; Hillenkamp *et al.*, 1991). Beim ESI-MS erfolgt die Ionisierung sehr schonend und das Auftreten von Fragmentierungen ist ein untergeordnetes Problem. Es können sehr empfindliche, aber auch nicht kovalent-gebundene Aggregate mit dem korrekten Molekulargewicht nachgewiesen werden. Obwohl die ESI-MS immer noch das am häufigsten eingesetzte Verfahren für die Lipidanalytik ist (Blanksby *et al.*, 2010), hat sich in den letzten Jahren MALDI-TOF MS als ein mögliches, alternatives Verfahren herauskristallisiert (Schiller *et al.*, 2004; Schiller *et al.*, 2007), da MALDI einige wichtige Vorteile aufweist (Fuchs *et al.*, 2010). Mit MALDI-TOF MS ist es z.B. möglich, sehr große Moleküle zu detektieren, es besitzt eine hohe Sensitivität und es entstehen kaum Fragment-Ionen. MALDI ist im Vergleich zu ESI eine sehr schnelle,

einfachere und wahrscheinlich auch empfindlichere Methode (Schiller *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 2010). Zudem hat sich auch gezeigt, dass die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit von MALDI-MS Daten mit den Daten von ESI-MS vergleichbar sind (Sun *et al.*, 2008).

1.7.1 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS ist ein massenspektrometrisches Verfahren das für verschiedenste chemische Verbindungen eingesetzt werden kann. MALDI-MS ist u.a. eine der schnellsten und genauesten Methode zur Bestimmung der Struktur der Wiederholungseinheiten von Polymeren, wird aber auch viel für die Analytik von Proteinen, Kohlenhydraten und (zunehmend) Fetten eingesetzt (Hillenkamp *et al.*, 1991). Aufgrund der Schnelligkeit, dem geringen Aufwand, der hohen Automatisierbarkeit und der hohen Empfindlichkeit gewinnt diese Methode immer größere Bedeutung, u.a. auch in der klinischen Diagnostik (Cho *et al.*, 2013; Page *et al.*, 2002). Ein weiterer nicht unwesentlicher Faktor ist, dass mit dieser Methode auch sehr polare und wenig flüchtige Makromoleküle, wie z.B. Proteine analysiert werden können. Die Fragmentierung des Analyten spielt nur eine sehr geringe Rolle, weshalb dieses Verfahren auch sehr gut für die Analyse von Gemischen (ohne eine vorhergehende Trennung) geeignet ist, wenn auch oft der Effekt der Ionenunterdrückung beobachtet wird, d.h. in Abhängigkeit von den enthaltenen funktionellen Gruppen werden die einzelnen Verbindungen mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten detektiert. Bei den Lipiden können beispielsweise die kleineren LPC mit einer höheren Empfindlichkeit detektiert werden als PC (Bresler *et al.*, 2011) und PE ist in Gegenwart von PC kaum nachweisbar. Den schematischen Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers zeigt die nachfolgende Abbildung:

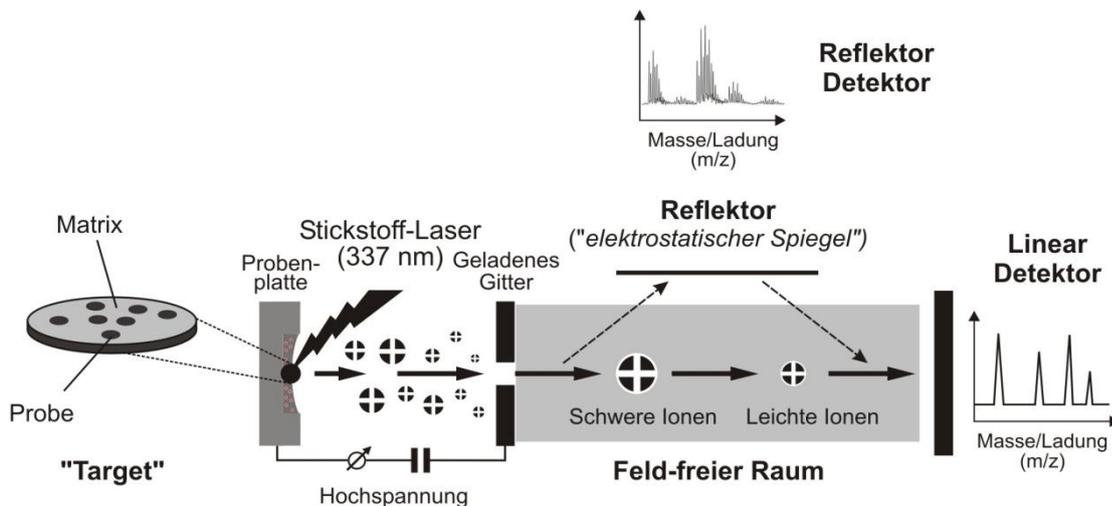


Abb. 6: Aufbau und schematisierte Funktionsweise eines MALDI-TOF MS.

Das Analyt-Matrix-Gemisch, das zunächst auf einen speziellen Probenteller („Target“) aufgetragen wird, wird ionisiert und die entstandenen Quasi-Moleküle in einem elektrischen Feld beschleunigt. Beim Durchlaufen einer feldfreien Strecke (TOF) erfolgt die Massentrennung, entweder im Reflektor- oder linearen Detektormodus. Details sind im nachfolgenden Text verfügbar (Schiller *et al.*, 2004).

Wie in der obigen Abbildung zu sehen ist, wird die Probe samt Matrix zunächst auf ein "Target" gegeben. Die Ionisation der Probe erfolgt durch Beschuss mit einem Laser (meist eines Stickstofflasers, der im UV-Bereich emittiert (oft 337 nm)). Für die erfolgreiche Ionisation und die breite Anwendung des Verfahrens ist der Einsatz einer "Matrix" notwendig, die im Idealfall exakt bei der Emissionswellenlänge des Lasers ein Absorptionsmaximum besitzt. Bei Anregung im UV-Bereich bedingt dies die Verwendung von Matrixsubstanzen mit wenigstens einem Phenylrest. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) ist eine der am meisten verwendeten (UV)-MALDI-Matrizes. DHB besitzt neben einer hohen Absorption bei 337 nm noch zwei weitere wichtige Vorteile: Zum einen ist DHB unter Hochvakuumbedingungen völlig stabil und verfügt zum anderen über eine Carboxylgruppe, was die Bildung von positiv geladenen Quasi-Molekülionen ermöglicht. Diese entstehen in Gegenwart von H^+ (Säurefunktion der Matrix oder Zusatz einer schwachen organischen Säure) oder durch andere Ionen wie z.B. Na^+ (Bsp.: $(M+H)^+$ oder $(M+Na)^+$, wobei das M für das neutrale Analytmolekül steht). Quasi-Molekülionen sind somit ionisierte Moleküle, bei denen sich die Molmasse durch die Anlagerung von Protonen von dem Ausgangsmolekül unterscheiden. Daneben können auch Anionen durch Abspaltungen von Kationen aus dem Analyten entstehen. Obwohl somit auch die Detektion von negativen Ionen möglich ist (je nach pK-Wert des Analyten), ist die Positiv-Ionendetektion noch immer das am meisten verwendete Verfahren. Die

zweite inzwischen immer mehr (vor allem auch in dieser Arbeit) eingesetzte Matrix ist das 9-AA (9-Aminoacridin). Auch diese Matrix hat einige Vorteile: Im Gegensatz zu vielen anderen Matrizes, kann man mit 9-AA sehr gute Spektren im negativen Ionenmodus aufnehmen (Sun *et al.*, 2008). Hier ist außerdem der Matrixhintergrund im Vergleich zu anderen Matrizes wie z.B. DHB nur sehr gering (Schiller *et al.*, 2007). Überraschenderweise generiert 9-AA bei positiv-Ionen-Detektion im Wesentlichen nur H^+ Addukte und nur sehr wenige Na^+ Addukte, was auf eine hohe Natriumionenaffinität dieser Matrix schließen lässt. Die überwiegende Generierung von Protonen-Addukten erleichtert die Identifizierung einzelner Lipide in komplexen Lipidgemischen (Sun *et al.*, 2008). Nicht zuletzt weist 9-AA eine höhere Sensitivität als die meisten anderen Matrizes (z.B. DHB) auf (Sun *et al.*, 2008).

Die Matrix wird in der Regel im großen Überschuss zum Analyten verwendet. Dadurch isoliert die Matrix die einzelnen Moleküle/Ionen von einander und die Bildung unerwünschter Cluster-Ionen (z.B. Dimere oder Matrix/Analyt-Cluster) kann so weitgehend vermieden werden.

Durch den Laserbeschuss verdampft die Matrix und "reißt" dabei die Analysesubstanz mit in die Gasphase. Durch Stöße mit z.B. Protonen oder in der Probe vorhandenen Kationen (Na^+ oder K^+) kommt es zur Bildung von Ionen, dem wichtigsten Kriterium um die MS überhaupt anwendbar zu machen, da das neutrale Analytmolekül nicht nachgewiesen werden kann. Obwohl die Prozesse der Ionenentstehung beim MALDI noch immer nicht vollständig verstanden sind, scheint der direkte Übergang von der festen Phase in das Hochvakuum und die damit verbundene Abkühlung sehr wesentlich für den schonenden Ionisationsverlauf zu sein (Knochenmuss *et al.*, 2006). Die entstandenen Quasi-Molekülionen werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt und dann "sich selbst" überlassen. Dabei durchlaufen die Ionen eine feldfreie Strecke (time-of-flight, TOF), bei der eine Massentrennung erfolgt. Die leichteren Ionen erreichen den Detektor schneller, als die schwereren; werden also nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung aufgetrennt (Schiller *et al.*, 2000).

Es ergibt sich aufgrund des Energieerhaltungssatzes folgende Formel:

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U$$

Das Produkt aus der Ionenladung (z), der Elementarladung (e) und der Beschleunigungsspannung (U) ist somit direkt proportional zum Produkt der Masse (m) und dem Quadrat der Geschwindigkeit (v) des Ions. Bei einem "TOF"-Spektrum wird grundsätzlich die Zeit (t) gemessen, die die Ionen benötigen um die Flugstrecke zu überwinden. Aus der Zeit kann man das Masse/Ladungsverhältnis (m/z) direkt berechnen.

$$\frac{m}{z} = 2 \cdot E_{kin} \cdot \frac{t^2}{s^2}$$

Je länger der feldfreie Weg, desto "besser" werden die Spektren aufgelöst. Bei einem normalen TOF Massenspektrometer mit einem sogenannten "linearen" Detektor ist die Auflösung daher eher gering. Um die Auflösung zu verbessern, muss die Fluglänge des TOFs erweitert werden. Dies ist möglich, indem entweder das Flugrohr verlängert wird oder, platzsparender, ein oft als „elektrostatlischer Spiegel“ bezeichneter Reflektordetektor verwendet wird. Dabei spricht man dann von dem "Reflektormodus" (Schiller *et al.*, 2007). Obwohl MALDI (als Ionenquelle) mit verschiedenen Massenanalysatoren kombiniert werden kann, ist die Kombination von MALDI und TOF am meisten verbreitet, da es diese Kombination erlaubt auch sehr große Moleküle (wie z.B. Proteine) über einen fast unbegrenzten Massenbereich zu untersuchen (Kaufmann *et al.*, 1995).

2 Aufgabenstellung

In den letzten Jahren hat sich MALDI-TOF MS als wichtige Methode zur Lipidanalyse etabliert (Schiller *et al.*, 2004; Schiller *et al.*, 2007; Emerson *et al.*, 2010). Allerdings gibt es immer noch eine Reihe von Problemen, wenn es um die quantitative Auswertung der Spektren geht. Daher besteht der erste Teil dieser Arbeit darin, die Methode MALDI-TOF MS bestmöglich für die relative Quantifizierung ausgewählter Phospholipide zu optimieren. Diese Optimierung erfolgte zum einen mit Lipidstandards, zum anderen mit biologischen Materialien. Diese biologischen Proben (isolierte Spermien und Seminalplasma) sind durch die geplante Fertilitätsdiagnostik begründet.

Der Fokus im zweiten Teil der Arbeit ist die Analyse der Lipidzusammensetzung humaner Spermien und dessen Seminalplasma. Es ist bekannt, dass die männliche Fertilität bei fettleibigen bzw. adipösen Männern sinkt. Möglicherweise liegt dies an einem Zustand eines systemischen oxidativen Stresses (Ozata *et al.*, 2002; Furukawa *et al.*, 2004). Da LPC ein bioaktives, proinflammatorisches Lipid ist und vor allem unter pathologischen Bedingungen in größeren Mengen erzeugt wird (Matsumoto *et al.*, 2007), ist der Fokus im zweiten Teil der Arbeit ein Vergleich von fettleibigen und normalgewichtigen Spermien Spendern, wobei der Schwerpunkt auf dem PC/LPC-Verhältnis liegen soll. Ziel ist, das PC/LPC-Verhältnis als einen nützlichen Marker für die Spermienqualität zu etablieren und somit zukünftige Untersuchungen hinsichtlich der Spermienqualitäten zu erleichtern und zu beschleunigen, da MALDI-MS zum "High-Throughput" Screening geeignet ist.

Im dritten Teil der Arbeit standen die murinen Spermien aus der Epididymis im Mittelpunkt. Die Spermien werden im Testis gebildet und reifen in der Epididymis heran bzw. werden dort gespeichert. Während der Reifung in der Epididymis kommt es zu einer Reihe von Umbauprozessen in der Spermienmembran. Deshalb wurden in diesem Teil der Arbeit Spermien aus Cauda (Schwanzbereich) und Caput (Kopfbereich) isoliert und mittels MALDI-TOF MS die Lipidzusammensetzung bestimmt. Es sollte nachgewiesen werden, dass bei den Umbauprozessen auch die Membranlipide (besonders PC) beteiligt sind, und dass anhand der Lipidzusammensetzung Rückschlüsse auf den Reifungsgrad der Spermien möglich sind.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Geräte, die zur Laborgrundausrüstung gehören, wie Pipetten, Handschuhe und Kühlschränke, werden nicht näher benannt. Zusätzlich wurden folgenden Geräte bzw. Programme verwendet:

MALDI-TOF Massenspektrometer "Autoflex",
 Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Deutschland
 (Software: flexControl™, Version 3.0)

3.1.2 Materialien und Chemikalien

Alle Lösungsmittel (wie Chloroform, Methanol, Isopropanol, Ethanol, Acetonitril und Aceton) wurden in der größtmöglichen Reinheit von Fluka Feinchemikalien GmbH (Teil von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) erworben. Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien/ Lösungsmittel	Firma
Aceton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Acetonitril	Fluka Feinchemikalien GmbH, Taufkirchen, Deutschland
9-Aminoacridin (9-AA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Cäsiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Fluka Feinchemikalien GmbH, Taufkirchen, Deutschland
2,5-DHB	Fluka Feinchemikalien GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS (Phosphatpuffer)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure	Fluka Feinchemikalien GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Ausgewählte Lyso- und Phospholipide wurden als 10 mg/ml Chloroformlösung von Avanti Polar Lipids (Alabaster, MA, USA) gekauft und ohne weitere Aufreinigung, aber nach Verdünnung mit den entsprechend angegebenen Lösungsmitteln auf (in den meisten Fällen) 200 µg/ml verwendet. In der folgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Standardlipide aufgelistet.

Tab. 5: Übersicht über die eingesetzten Standard-Phospholipide

Phospholipide	Synonym
1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	PC 16:0 / 18:1
1-myristoyl-2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	PC 14:0 / 16:0
1-nonadecanoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	LPC 19:0
1-lignoceroyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	LPC 24:0

3.2 Methoden

3.2.1 Eingesetzte Matrizes

Für die Messungen der Lipidproben am MALDI-TOF MS wurden 2 verschiedene Matrizes verwendet: 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) von Fluka (Neu Ulm) wurde in einer Konzentration von 0.5 M (ca. 77 mg/ml) in Gegenwart verschiedener Lösungsmitteln wie Methanol (Schiller *et al.*, 2007), Chloroform, Ethanol, Isopropanol, Isopropanol/Acetonitril oder Aceton eingesetzt. 9-Aminoacridin (9-AA) (aus dem Lieferprogramm von Acros Organics, vertrieben durch Fischer Forschung GmbH, Nidderau, Deutschland) wurde als 10 mg/ml Lösung in Isopropanol/Acetonitril (60:40 (v:v)) (Sun *et al.*, 2008) oder in verschiedenen anderen Lösungsmitteln wie Chloroform, Ethanol, Isopropanol oder Aceton gelöst, verwendet.

3.2.2 Humane Spermienisolation

Die Spermien wurden in der Andrologischen Abteilung der Hautklinik des Universitätsklinikums Leipzig gewonnen und im Rahmen einer bestehenden Kooperation zur Verfügung gestellt. Das humane Ejakulat der Spender wurde, nach einer sexuellen Enthaltensamkeit von 3 Tagen, mittels Masturbation in ein steriles Gefäß gewonnen. Dabei wurden die Männer entsprechend ihres BMI in Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe entsprach Normalgewicht mit einem BMI zwischen 20.0-24.9 kg/m². Die zweite Gruppe umfasste Männer mit Übergewicht, d.h. einem BMI zwischen 25.0-29.9 kg/m². In die dritte Gruppe waren fettleibige Männer mit einem BMI \geq 30 kg/m² eingruppiert, wobei es noch eine Untergruppe gab mit Männern, die einen BMI \geq 35 kg/m² hatten. Nach Abgabe des Ejakulates in ein Gefäß erfolgte die Verflüssigung, wozu die Ejakulatproben für 30 min bei RT inkubiert wurden. Ein Aliquot des Ejakulates wurde für die Bestimmung verschiedener Spermienparameter in Übereinstimmung mit den WHO-Empfehlungen (WHO 2010) verwendet. Durch Zentrifugation bei 500 \times g für 10 min wurde das Ejakulat in Spermien und Seminalplasma (SP) getrennt. Das SP wurde vorsichtig abgenommen und nach einer Lipidextraktion mit Chloroform/Methanol für die Messung am MALDI-TOF MS verwendet. Das Pellet wurde anschließend in EBSS (Earl's Balanced Salt Solution), einer aus verschiedensten Salzen und Glucose bestehender Lösung, resuspendiert und auf eine Zellzahl von 50x10⁶ Spermien/ml eingestellt. Die

Spermien wurden analog zum SP für die nachfolgenden Messungen verwendet. Die jeweils eingesetzten Zellzahlen sind in den entsprechenden Grafiken angegeben.

3.2.3 Artifizielle Veränderung der Phospholipidextrakte der Spermien

Die Phospholipide der Spermien wurden mittels des Enzyms Phospholipase A₂ verdaut, um die entsprechenden Lysophospholipide zu erhalten (Fuchs *et al.*, 2007). Aliquots der organischen Extrakte wurden dazu zunächst eingedampft. Um die Lipid-Vesikel zu resolubilisieren, wurde 50 mM Phosphat-Puffer mit einem pH 7,4 zugegeben und intensiv gevortext. Die Vesikel werden mit 0,5 mg/ml PLA₂ für 2 h bei 37°C versetzt. Anschließend wurden die Phospholipide wie oben beschrieben extrahiert.

3.2.4 Murine Spermengewinnung aus der Epididymis

Es wurden 20 Mäuse (18 C57BL/6N (3 Monate alt) und 2 BALB/c (10 Monate alt)) verwendet. Alle Mäuse wurden extra für diesen Versuch herangezüchtet. Die Tierexperimente wurden entsprechend der europäischen Richtlinien vom 24. November 1986 (86/609/EEC) durchgeführt. Alle Tiere wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten, besonders bei gleicher Ernährung.

Nach der Hoden- und Nebenhodenentfernung, wurde die Epididymis von den Gonaden entfernt. Die Epididymis wurde in drei Teile gegliedert, den Kopf (Caput), Körper (dieser wurde verworfen und nicht für die Analyse verwendet) und den Schwanz (Cauda). Nach Entfernung der Blutgefäße wurden die beiden Caudas und die beiden Caputs jeweils in eine Petrischale gegeben und mit Dulbecco's Phosphatpuffer (PBS) (enthielt standardmäßig CaCl₂ und MgCl₂) gewaschen, um die Spermien daraus zu isolieren. Die im PBS enthaltenen Spermien wurden mittels einer Pipette gesammelt und über einen 30 µm Filter gefiltert, wobei die Spermien ins Filtrat gehen und größere Gewebereste auf dem Filter verbleiben. Für die Untersuchung der Motilität wurden die Proben vorher für 10 min bei 37°C in PBS inkubiert. Die Motilität wurde unter dem Mikroskop bestimmt. Anschließend wurden die Spermien zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (600 × g, 5 min). Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Spermienkonzentration auf 1×10⁶ Zellen/ml Medium eingestellt und eine Lipidextraktion durchgeführt. Die Extrakte wurden anschließend mittels MALDI-TOF MS charakterisiert.

3.2.5 Lipidextraktion biologischer Proben

Die Lipidextraktion wurde entsprechend der Bligh & Dyer (1959) Methode durchgeführt. Wie bei allen Extraktionsverfahren kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass es zu Lipidverlusten (insbesondere von hochpolaren Lipiden) kommt. Allerdings ist es ein enormer Vorteil, dass durch die Extraktion störende Substanzen wie Proteine, Nukleinsäuren und Salze direkt abgetrennt werden, da sie in der wässrigen Phase bleiben bzw. an der Phasengrenze ausfallen. Die Extraktion erfolgt durch Zugabe von Methanol und Chloroform. Für die humanen Spermien wird ein Verhältnis von (1/1/1, v/v/v) (Probe / Methanol / Chloroform) verwendet. Für die Extraktion von SP und Blutplasma wird ein Verhältnis von 1/1/2, also ein erhöhter Anteil von Chloroform benötigt, da hier ein viel höherer Proteinanteil vorliegt, was die Phasentrennung problematisch macht. Die Probe wurde 1 min stark gevortext und bei $1000 \times g$ für 5 min bei 20°C zentrifugiert. Anschließend wurde die organische (untere) Phase mittels einer Hamilton-Spritze abgenommen. Diese Probe wurde direkt, d.h. ohne weitere Aufreinigung aber nach Zusatz der erforderlichen Matrix mittels MALDI-TOF MS untersucht. In der folgenden Abbildung ist dieses Extraktionsverfahren schematisch dargestellt.

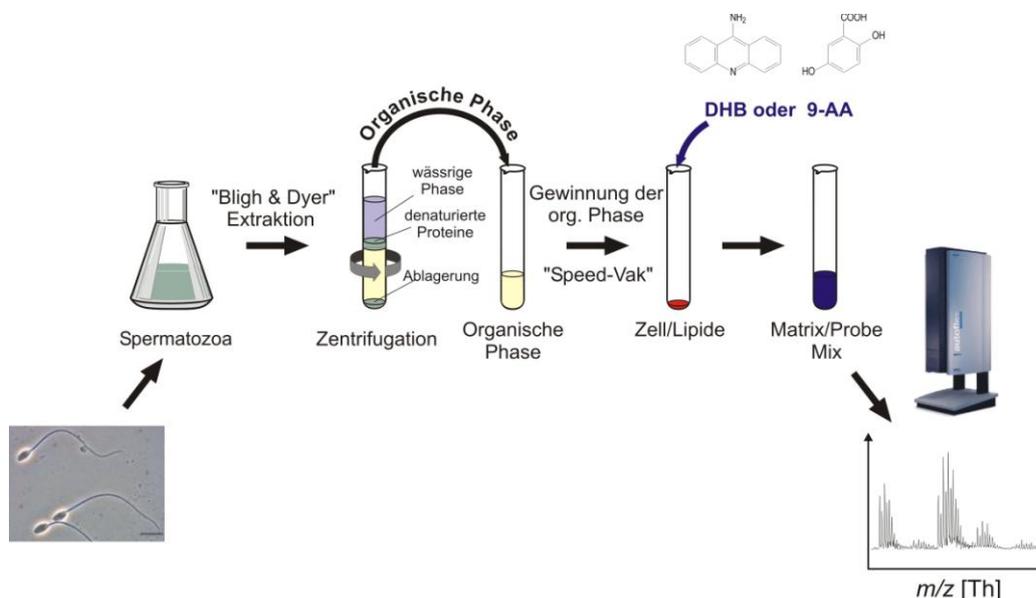


Abb. 7: Modifizierte "Bligh & Dyer"-Extraktion

Schematische Darstellung der Extraktion isolierter Spermien und nachfolgender Messung des Lipid-Matrix-Gemischs mittels MALDI-TOF MS.

3.2.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Alle Proben wurden in der Regel direkt (also ohne vorherige Aufreinigung) mittels MALDI-TOF MS, sowohl im Positiv- als auch im Negativ-Ionenmodus, charakterisiert. Für die Messung wurde 1 µl Extrakt mit 1 µl entsprechender Matrix (in der Regel DHB oder 9-AA) gemischt und auf ein MALDI-TOF Target aufgetragen. Die (nach Kristallisation bei Raumtemperatur) entstandenen Mischkristalle wurden dann direkt untersucht. Das verwendete MALDI-TOF Massenspektrometer nutzt einen gepulsten Stickstofflaser (50 Hz) mit einer Emissionswellenlänge von 337 nm. Die Beschleunigungsspannung betrug in allen Fällen 20 kV und das "gated" Verfahren wurde zur Unterdrückung der Matrixsignale verwendet. Eine detaillierte methodische Beschreibung des MALDI-TOF MS mit dem Fokus auf Lipidanalyse ist bei (Schiller *et al.*, 2004) und (Fuchs *et al.*, 2010) zu finden. Die erhaltenen Rohdaten wurden mittels der Software „Flex Analysis“ Version 2.2 (Bruker Daltonics) ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung der MALDI-TOF MS Methode

Die MALDI-TOF MS Methode ist eine zunehmend wichtige und gute Möglichkeit für die Analyse komplexer Lipidgemische (Angelini *et al.*, 2012). Trotz bereits bestehender breiter Anwendungsgebiete (wie z.B. das MALDI-MS "Imaging") gibt es noch einige quantitative und qualitative Probleme bei der Durchführung und der Interpretation der Spektren. Wird eine nicht geeignete Matrix bzw. die Matrix in einem weniger geeigneten Lösungsmittel verwendet, beeinträchtigt dies erheblich die Spektrenqualität. Des Weiteren gibt es auch Probleme bei der Untersuchung von Lipidgemischen (Petković *et al.*, 2001), da es in hohem Maße zum Phänomen der Ionenunterdrückung kommt, d.h. nicht alle Lipidklassen werden mit gleicher Empfindlichkeit detektiert. Bei der Messung ist es außerdem essentiell geeignete Konzentration der relevanten Lipide einzusetzen. Ist die Lipidkonzentration zu hoch, liegt die Matrix nicht in ausreichendem Überschuss vor, was die Spektrenqualität reduziert. Ist die Lipidkonzentration hingegen zu gering, wird das Signal-Rausch-Verhältnis reduziert (Bresler *et al.*, 2011). Deswegen ist das erste Ziel dieser Arbeit die qualitative und quantitative Auswertbarkeit der MALDI-Spektren von Spermienextrakten zu optimieren.

Optimierung unter Verwendung von Standardlipiden

Für die Optimierung wurden zunächst die Spektren verschiedener Mischungsverhältnisse von PC 16:0/18:1 und LPC 19:0 untersucht. Diese Gemische wurden nach Zugabe der Matrix (DHB oder 9-AA) in jeweils gleichen Volumenanteilen mittels MALDI-TOF MS charakterisiert.

Ergebnisse

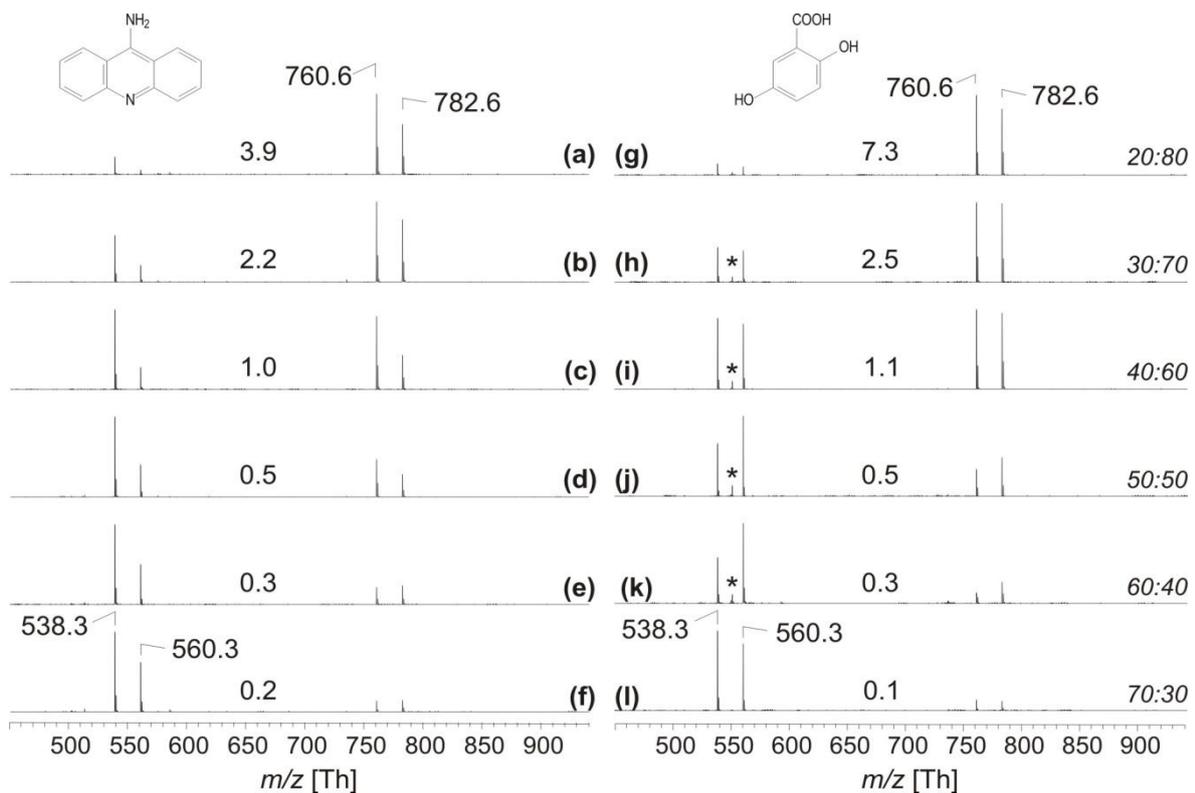


Abb. 8: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren unterschiedlicher Proben mit variablen Verhältnissen zweier ausgewählter Lipide.

Die Standardlipide LPC 19:0 und PC 16:0/18:1 wurden in unterschiedlichen Verhältnissen auf das MALDI-Target aufgetragen und anschließend die Spektren im Positivionenmodus aufgenommen. Die Spektren auf der linken Seite wurden mit 9-AA, auf der rechten Seite mit DHB aufgenommen. Die Strukturen beider Matrices sind im oberen Teil der Abbildung zu sehen. Es wurden verschiedene Verhältnisse beider Lipide (LPC/PC (w/w) mit einer absoluten Konzentration von 200 µg/ml) gemessen (20:80 (a, g), 30:70 (b, h), 40:60 (c, i), 50:50 (d, j), 60:40 (e, k) und 70:30 (f, l)). Die absolute Lipidmenge wurde jedoch in allen Fällen konstant gehalten. In der Abbildung sind auch die Verhältnisse der Peakintensitäten von PC und LPC angegeben (Summe beider Addukte (H^+ und Na^+)). Der mit "*" gekennzeichnete Peak ist auf ein Clusterion der eingesetzten DHB-Matrix, das in der Gasphase entsteht, zurückzuführen (Schiller *et al.*, 2007).

Die Spektren in Abb. 8 wurden alle im Positivionenmodus aufgenommen, d.h. es werden nur die entstandenen, positivgeladenen Ionen detektiert. Fast alle Phospholipide können mit geeigneter Matrix auch im Negativionenmodus detektiert werden. Allerdings ist die Sensitivität im Positivionenmodus wesentlich (fast 2 Größenordnungen) höher. Dies ist der Grund, warum in der vorliegenden Arbeit fast nur die positiv-Ionenspektren aufgenommen wurden. Für die Spektren auf der linken Seite wurde als Matrix 9-AA, auf der rechten Seite DHB verwendet. Da bei allen nachfolgenden Experimenten die Phosphatidylcholine und Lysophosphatidylcholine im Fokus stehen werden, wurden PC 16:0/18:1 und LPC 19:0 als Standardlipide für die Optimierung der Messbedingungen eingesetzt. Beide Lipide wurden mit verschiedenen relativen Verhältnissen, aber der gleichen absoluten Lipidmenge (200 µg/ml) untersucht. Unter diesen Bedingungen erhält man sehr gute Spektren,

mit einem hervorragenden Signal-Rausch-Verhältnis (Bresler *et al.*, 2011). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Nimptsch *et al.* (2009), wo vergleichbare Optimierungen mit Glykosaminoglykanen, d.h. sauren Kohlenhydraten durchgeführt wurden. In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit diskutierten Peaks sowie die Zuordnungen zu den entsprechenden Lipiden aufgelistet. Die hier aufgelisteten Verbindungen wurden alle im Positivionenmodus detektiert. Das Seminolipid (SL) kann zwar im Positivionenmodus bei $m/z = 841.6$ detektiert werden, wird in der Regel allerdings bevorzugt (aufgrund seines Charakters als azide Verbindung) im Negativionenmodus bei $m/z = 795.6$ nachgewiesen.

Tab. 6: Detektierte Lipide mit entsprechenden m/z -Werten

m/z [M+H] ⁺	m/z [M+Na] ⁺	Zuordnung (pos Ionenmodus)
496.3	518.3	LPC 16:0
522.3	544.3	LPC 18:1
524.3	546.3	LPC 18:0
538.3	560.3	LPC 19:0
544.3	566.3	LPC 20:4
551.0		Matrix-Peak von DHB
562.4		Unbekannt
568.3	590.3	LPC 22:6
570.3	592.3	LPC 22:5
585.0		Clusterion von 9-AA
596.3	618.3	Formyl LPC 22:6
703.6	725.6	SM 16:0
731.6	753.6	SM 18:0
758.6	780.6	PC 16:0/18:2
759.6	781.6	SM 20:0
760.6	782.6	PC 16:0/18:1
762.6	784.6	PC 16:0/18:0
768.6	790.6	PE 18:0/20:4
782.6	804.6	PC 2x18:0
784.6	806.6	PC 18:0/18:3
785.6	807.6	SM 22:1
786.6	808.6	PC 18:0/18:2

787.6	809.6	SM 22:0
790.6	812.6	PC 16:0 _{alkenyl} /22:6 _{acyl}
792.6	814.6	PC 16:0 _{alkyl} /22:6 _{acyl}
806.6	828.6	PC 16:0/22:6
808.6	830.6	PC 16:0/22:5
810.6	832.6	PC 18:0/22:4
834.6	856.6	PC 18:0/22:6
836.6	858.6	SM 24:0
	841.6	SL

Sowohl das PC als auch das LPC sind leicht detektierbar: die H⁺ und Na⁺ Addukte von PC 16:0/18:1 werden bei $m/z = 760.6$ und 782.6 und die entsprechenden Addukte von LPC 19:0 bei $m/z = 538.3$ und 560.3 detektiert. In dem gezeigten Massenbereich der Spektren sind keine Fragment-Ionen nachweisbar; nur die Peakverhältnisse verändern sich entsprechend der eingesetzten Anteile der beiden Lipide.

Ein Überschuss an Phosphatidylcholin entspricht den (z.B. in den Spermien) zu erwartenden physiologischen Verhältnissen, da LPCs Detergenzien sind und deshalb nur in vergleichsweise geringen Mengen vorliegen. Da die Methodenoptimierung anhand von Standardlipiden die zu erwartenden physiologischen Bedingungen möglichst widerspiegeln soll, wurde in den nachfolgend beschriebenen Versuchen ein PC/LPC-Verhältnis von 80:20 (w/w) bei einer absoluten Gesamtkonzentration (PC und LPC) von 200 µg/ml eingesetzt.

Optimierung der Laserintensität und Reflektorspannung

Die Qualität der Massenspektren kann durch verschiedene Geräte-Einstellungen, insbesondere der Laserintensität (Knochenmuss *et al.*, 2006) und der Reflektorspannung am Massenanalysator beeinflusst werden. Zunächst wurde der Einfluss der Laserintensität auf die Qualität der Spektren und besonders auf das jeweilige PC/LPC-Verhältnis untersucht, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass Änderungen der Laserintensität von einer Veränderung der Peakintensität begleitet werden.

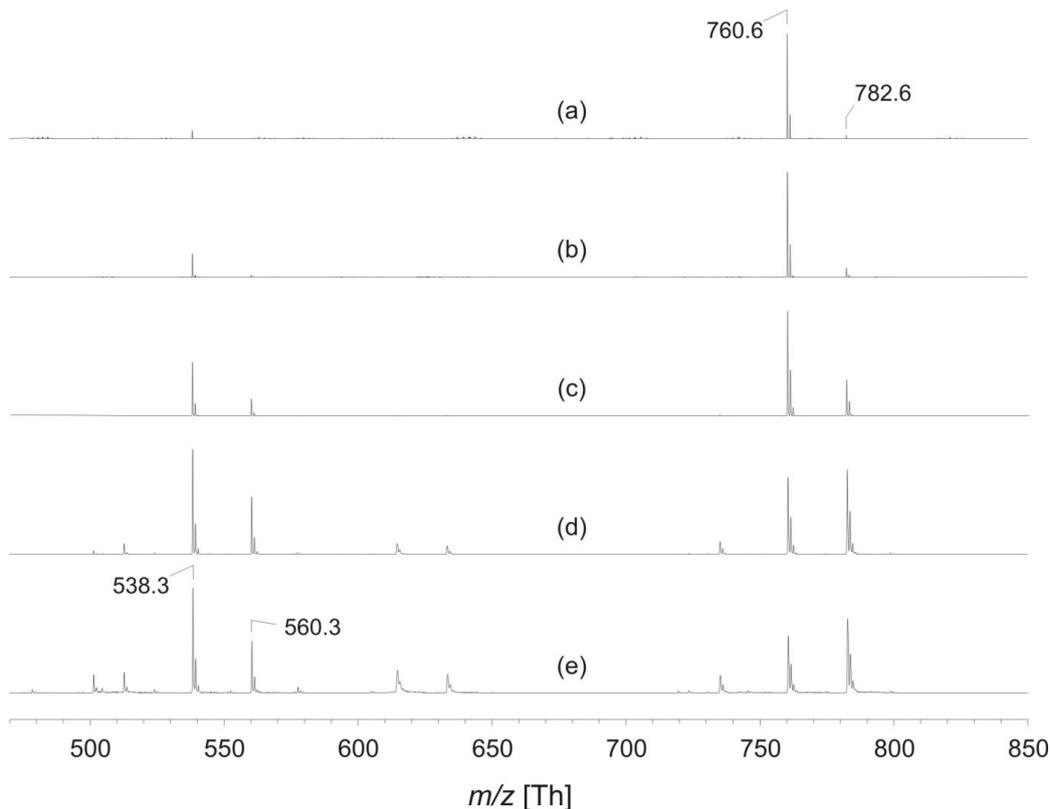


Abb. 9: Positiv-Ionen Massenspektren in Abhängigkeit von der Laserintensität.

Im Positivionenmodus mit 9-AA aufgenommene Spektren eines PC/LPC Gemisches (80:20 (w/w) bei einer absoluten Konzentration von 200 µg/ml) in Abhängigkeit von der Laserintensität. Steigende Laserintensität von oben nach unten (a: 20%, b: 29%, c: 34%, d: 40%, e: 46%). Die absolute Lipidmenge auf der MALDI-Platte betrug in allen Fällen 0,2 µg. Alle anderen Bedingungen wurden konstant gehalten.

Die Standardlipide PC 16:0/18:1 und LPC 19:0 wurden im festen Verhältnis 80:20 (w/w) bei einer absoluten Konzentration von 200 µg/ml mit einer absoluten Lipidmenge von 0.2 µg gemessen. Die einzige Variable ist die (von oben nach unten) steigende Laserintensität. In Abb. 9 sind nur die mit 9-AA aufgenommenen Spektren gezeigt. Bei Anwendung von DHB resultieren ähnliche Spektren (nicht gezeigt), die aber stärker verrauscht sind, da DHB eine weniger empfindliche Matrix als 9-AA ist (Sun *et al.*, 2008). Man erkennt, dass sich die Verhältnisse von PC zu LPC verändern, wobei das LPC bei höheren Laserintensitäten verstärkt detektiert wird. Die Intensitäten der Na⁺ Addukte beider Lipide steigen signifikant an. Mit steigender Laserintensität werden außerdem immer höhere Peakintensitäten (nicht dargestellt) erhalten, aber auch mehr Fragment-Ionen nachgewiesen. Die Peaks bei $m/z = 614.3$ und 636.3 entsprechen einer Spaltung an der Doppelbindung und $m/z = 735.6$ kann durch Verlust der Kopfgruppe von PC 16:0/18:1 erklärt werden.

Ergebnisse

Neben der Laserintensität wurde auch der Einfluss der Reflektorspannung untersucht. Dafür wurde erneut ein PC/LPC Gemisch im Verhältnis 80:20 (w/w) und einer absoluten Lipidmenge von 0,2 µg auf der MALDI-Platte untersucht. Die Laserintensität wurde bei 25% konstant gehalten und nur die Reflektorspannung erhöht (von oben nach unten). Die erhaltenen Spektren sind in der nachfolgenden Abbildung zu sehen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass an nahezu allen MALDI-Geräten die Laserintensität lediglich mittels einer relativen Skala geregelt wird: Die absolute Energie, die der Laser emittiert, kann zwar bestimmt werden; allerdings ist die von der Probe tatsächlich absorbierte Energie von einer Vielzahl weiterer Parameter abhängig (insbesondere dem Extinktionskoeffizienten der Matrix) und deshalb sehr schwierig zu bestimmen.

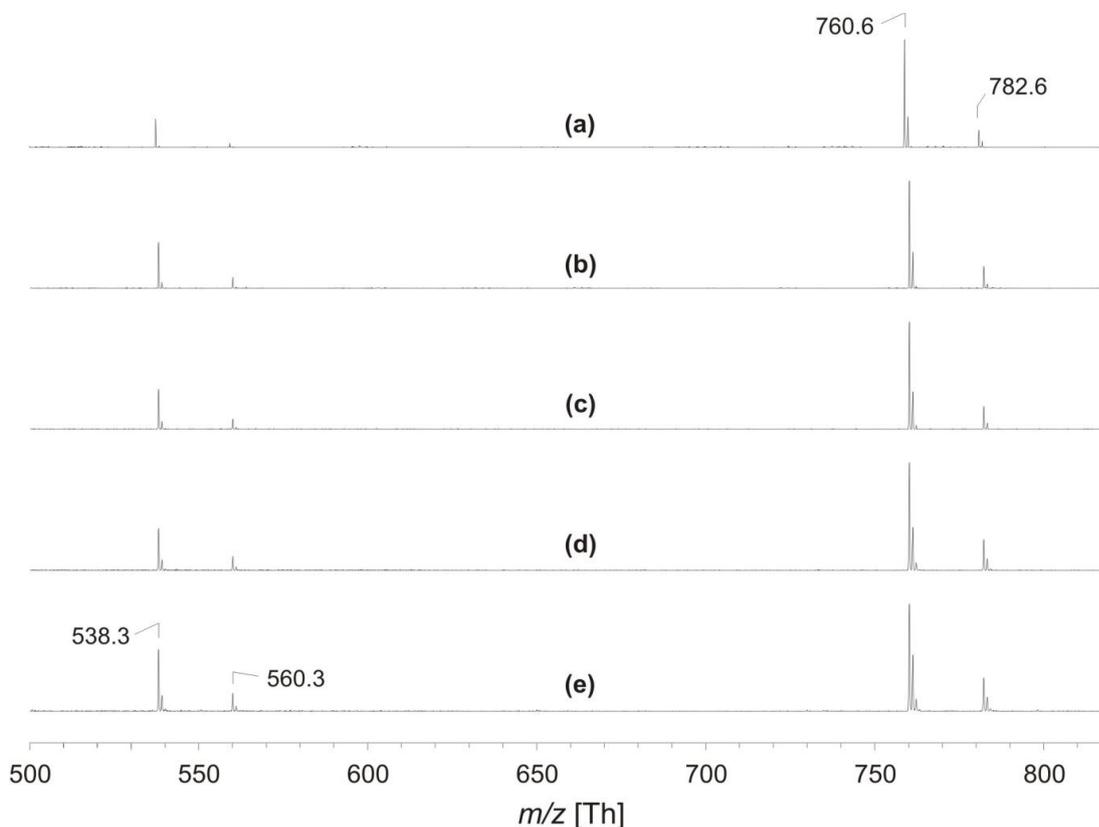


Abb. 10: Positiv-Ionen Massenspektren mit steigender Reflektorspannung.

Im Positivionenmodus aufgenommene Spektren eines PC/LPC Gemisches (80:20 (w/w)) mit steigender Reflektorspannung (a: 2,7, b: 3,5, c: 4,7, d: 6,6, e: 9,3). Die absolute Lipidmenge betrug in allen Fällen 0,2 µg. Die Laserintensität wurde konstant gehalten.

Bei Erhöhung der Reflektorspannung kommt es zu wesentlich geringeren Veränderungen der Spektren als im Falle der Laserintensität. Weder das Verhältnis der Peaks beider Lipide verändert sich signifikant, noch erfolgt eine Fragmentierung.

Um eine hohe Spektrenqualität zu erhalten, sollte somit die Reflektorspannung erhöht, aber die Laserintensität so gering wie möglich gehalten werden.

Optimierung verwendeter Matrices

Wie bereits eingangs festgestellt, zeichnet sich 9-AA durch eine wesentlich höhere Empfindlichkeit (bis zu 30-fach höher als bei DHB) aus (Sun *et al.*, 2008). Allerdings ist die Güte der Messung mit 9-AA sehr davon abhängig, welche Lösungsmittel eingesetzt werden (Sun *et al.*, 2008), während dieser Einfluss bei DHB als Matrix viel geringer ist. Deshalb war es notwendig verschiedene Lösungsmittel bzw. ausgewählte Gemische zu testen und die erzielbare Reproduzierbarkeit der Spektren zu untersuchen. Dafür wurde ein PC/LPC Gemisch (80:20 (w/w) bei einer absoluten Gesamtkonzentration von 200 µg/ml) in Chloroform bzw. ausgewählten anderen Lösungsmitteln verwendet. Mit jedem Lösungsmittel wurden 6 unabhängige Messungen durchgeführt. Die daraus ermittelten Standardabweichungen des PC/LPC-Verhältnisses sind in Abb. 11 gezeigt.

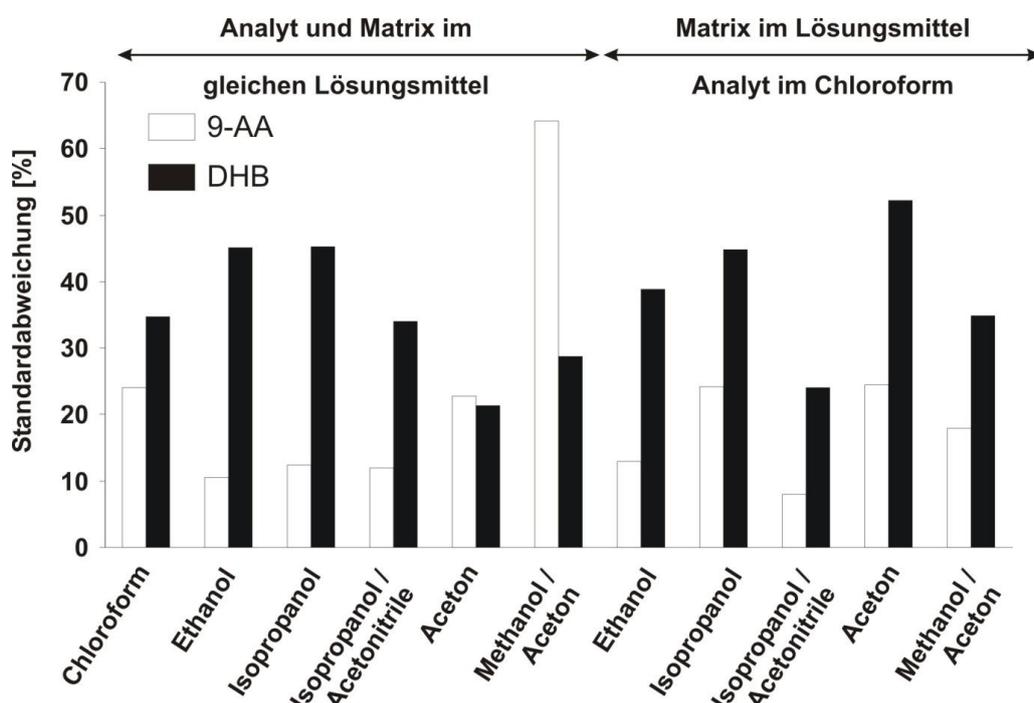


Abb. 11: Standardabweichung des massenspektrometrisch bestimmten PC/LPC-Verhältnisses unter Nutzung verschiedener Lösungsmittel.

Analyse der Standardabweichung (in %) des PC/LPC-Verhältnisses eines PC/LPC Gemisches (Verhältnis der Summe der Peakintensitäten der H⁺ und Na⁺ Addukte von PC bzw. LPC). Die MALDI-TOF MS Spektren wurden im Positivionenmodus aufgenommen. Im Diagramm sind die berechneten Standardabweichungen in Abhängigkeit der untersuchten Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische gezeigt. Laserintensität und Reflektorspannung wurden konstant gehalten.

Diese Optimierung wurde für DHB (schwarze Balken) und 9-AA (weiße Balken) durchgeführt. Zum einen wurden Matrix und Analyt im gleichen Lösungsmittel gelöst (linke Seite). Dafür wurden die in Chloroform vorliegenden Standardlipide eingedampft und (analog zur Matrix) mit dem entsprechenden Lösungsmittel aufgenommen. Zum anderen wurde nur die Matrix im zu untersuchenden Lösungsmittel gelöst, die Lipide verblieben im Chloroform (rechte Seite), was den Gegebenheiten bei der Lipidextraktion biologischer Proben entsprechen würde. Es ist ein signifikanter Einfluss der untersuchten Lösungsmittel für beide Matrizes zu sehen. Die Standardabweichung ist (bis auf Methanol/Aceton) bei DHB immer höher als bei 9-AA. Mit DHB betrug die Standardabweichung etwa 25-50% und mit 9-AA nur 10-25%, d.h. die Messungen mit DHB sind ungenauer. Die besten Ergebnisse erhält man unter Nutzung eines Gemisches von Isopropanol/Acetonitril (60:40 (v:v)) für beide Matrizes. Die Gegenwart von Chloroform hat keinen signifikanten Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse. Deswegen wurden alle folgenden Messungen mit DHB und 9-AA in Isopropanol/Acetonitril vorgenommen, wobei sich das relevante Lipidgemisch in Chloroform befindet. Dies beschleunigt auch die Durchführung der Messungen: Da die relevanten Lipide durch Extraktion mit Chloroform/Methanol aus der wässrigen Phase extrahiert werden, liegen die Lipide in der Regel in Chloroform gelöst vor.

Optimierung mit Standards in biologischen Proben

Alle bisherigen Optimierungsschritte wurden lediglich mit Standardlipiden durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass sich die Lipide in komplexen biologischen Gemischen (Lipidextrakten) genauso verhalten, wie unter standardisierten Bedingungen, wurde ein artifizielles PC/LPC Gemisch (80:20 (w/w) bei einer absoluten Konzentration von 200 µg/ml) zu humanem Seminalplasma gegeben, das sich sowohl durch den Protein- wie auch durch den Salzgehalt von "reinen" Lösungen unterscheidet. Nach der Extraktion erfolgte die Messung mittels MALDI-TOF MS.

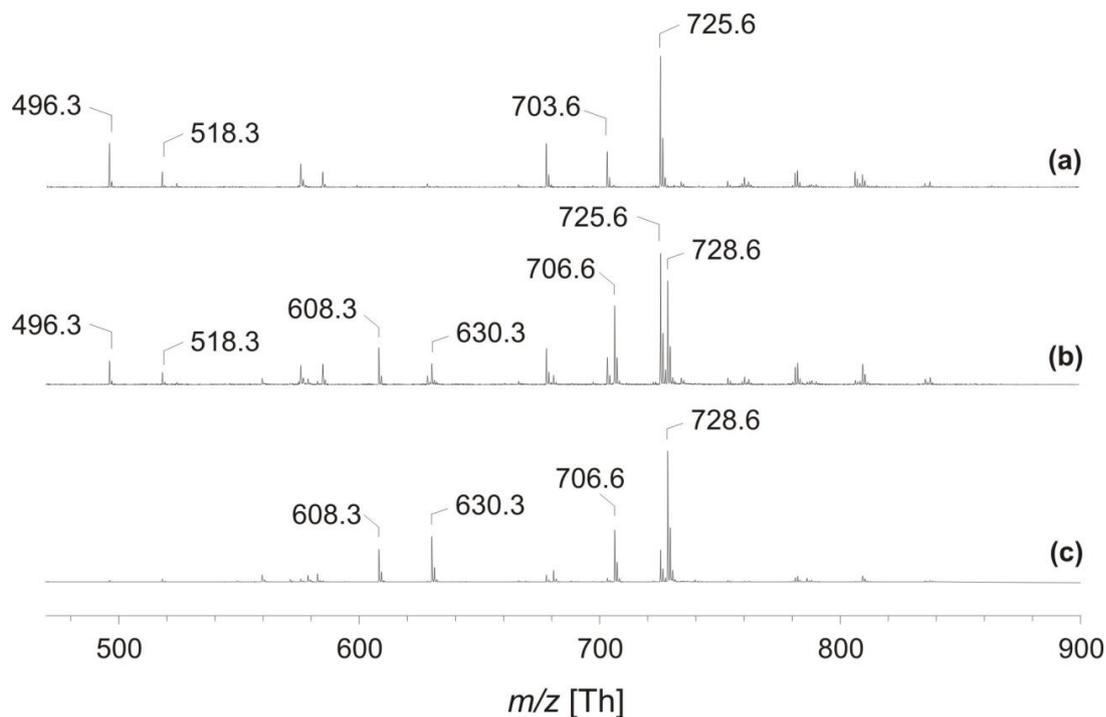


Abb. 12: Positiv-Ionen Massenspektren von SP in Gegenwart ausgewählter Standardlipide.

Die gezeigten MALDI-TOF Massenspektren wurden mit 9-AA im Positivionenmodus aufgenommen. Es wurde der native SP-Extrakt (a) und SP mit 5,7 µg/ml (b) und 14,3 µg/ml (c) PC/LPC Gemisch (1:1 (w/w) bei einer absoluten Konzentration von 200 µg/ml) gemessen. Nur die intensivsten Peaks sind mit den entsprechenden m/z -Werten gekennzeichnet.

In der Abb. 12 sind die Positiv-Ionen-Massenspektren von Extrakten humaner Seminalplasmen gezeigt. In Abb. 12 (a) wurde ein nativer SP-Extrakt, also ohne Zugabe von Standardlipiden gemessen. Vor allem das LPC 16:0 ($m/z = 496.3$ und 518.3) (Bresler *et al.*, 2011) und das SM 16:0 ($m/z = 703.6$ und 725.6) können aufgrund der permanenten positiven Ladungen ihrer Kopfgruppen sehr sensitiv detektiert werden. Zusätzlich wurden der SP-Probe PC/LPC Gemische (80:20) mit den finalen Konzentrationen von 5,7 µg/ml (b) und 14,3 µg/ml (c) zugegeben. Bei dem Standardgemisch handelte es sich um PC 14:0/16:0 ($m/z = 706.6$ und 728.6) und LPC 24:0 ($m/z = 608.3$ und 630.3). Nach Zugabe von 5,7 µg/ml (b) veränderte sich das Spektrum des SP nicht. Nur die artifiziell zugesetzten Lipide konnten zusätzlich detektiert werden. Eine höhere Menge an Standardlipiden (c) führt dann jedoch zu einer signifikanten Ionensuppression (Petković *et al.*, 2001), d.h. es werden nur noch die artifiziell zugesetzten Standardlipide, aber nicht mehr die Lipide aus dem SP detektiert.

4.2 Optimierung der Lipidextraktion verschiedener biologischer Proben

Die Grundlage der zu optimierenden Lipidextraktion war die „Bligh & Dyer“ Extraktion. Prinzipiell wird bei dieser Methode eine wässrige Probe mit Chloroform und Methanol versetzt. Anschließend wird das Gemisch intensiv gemischt und (zur Beschleunigung der Phasenseparation) zentrifugiert. Danach kann die organische (untere) Phase, die die Lipide enthält, mittels einer Hamilton-Spritze isoliert werden. Im wässrigen Überstand verbleiben alle anderen Substanzen, wie Zucker, Salze und Zelltrümmer. In der Probe enthaltene Proteine denaturieren dabei und fallen an der Phasengrenze aus. Obwohl die Möglichkeit besteht, dass ausgewählte Lipide an das denaturierte Protein gebunden sind und deshalb nicht in der organischen Phase nachgewiesen werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine genauere Analyse der Protein-Interphase verzichtet. Die einzelnen Schritte sind im Methodenteil 3.2.5 nachzulesen.

Zunächst wurde die Lipidextraktion humaner, isolierter Spermien optimiert. Dafür wurden die Dauer des Mischens ("Vortexen") und des Zentrifugierens als wesentliche Parameter untersucht. Um nach der Extraktion eine Aussage über die Lipidausbeute und somit auch indirekt über den Verlust bestimmter Lipide machen zu können, wurden zwei Standardlipide (LPC 24:0 und PC 14:0/16:0) in einer bekannten Konzentration zu den Spermienproben gegeben und mit extrahiert. Als Kontrolle wurde das Standardlipidgemisch direkt dem Spermienextrakt ohne anschließende Extraktion zugegeben. Die unter den verschiedenen Bedingungen erhaltenen Ausbeuten können Tab. 7 entnommen werden.

Tab. 7: Lipidausbeute (in %) in Spermienextrakten, die mit unterschiedlichen Extraktionsbedingungen gewonnen wurden

Überblick über die erzielten Lipidausbeuten (in %) ausgewählter Standardlipide aus humanen Spermienextrakten. Der Einfluss der Dauer des Mischens und des Zentrifugierens wurde untersucht.

Dauer des Mischens	Ausbeute in %		Dauer der Zentrifugation	Ausbeute in %
10 s	63		1 min	70
30 s	75		5 min	64
1 min	86		10 min	82
2 min	84		15 min	80

Aufgrund der mitgeführten Standards konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute am größten ist, wenn die Probe für 1 min gemixt und anschließend für 10 min zentrifugiert wird. Die Schwankungen der Ausbeute lagen unter 20%.

Zu den biologischen Proben, die in dieser Arbeit untersucht werden sollten, zählen neben den isolierten Spermien auch SP und Blutplasma. Daher musste auch die Extraktion dieser Proben optimiert werden: In Pilotexperimenten zeigte sich, dass die Extraktion von SP und vor allem Blutplasma, aufgrund der wesentlich höheren Proteingehalte, mit größeren Problemen als bei den Spermien verbunden war. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, entstehen bei der Extraktion drei Phasen. In der oberen wässrigen Phase sind Salze, Zucker und andere wasserlösliche Substanzen enthalten. In der Interphase befinden sich vor allem denaturierte Proteine und Zelltrümmer, die weder in wässriger noch organischer Phase löslich sind, sondern an der Phasengrenze ausfallen. Die untere organische Phase enthält nach der Extraktion das Chloroform mit den darin gelösten Lipiden.

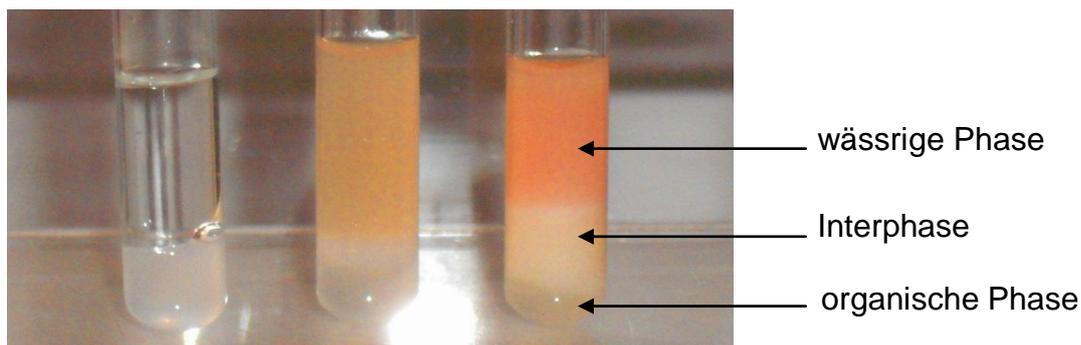


Abb. 13: Typische Probenröhrchen nach durchgeführter Lipidextraktion.

Es sind drei verschiedene biologische Proben dargestellt: Isolierte humane Spermien (50 Millionen/ml), SP und Blutplasma (von links nach rechts). Aufgrund der Extraktion und der nachfolgenden Zentrifugation resultieren drei deutlich erkennbare Phasen.

In der Abb. 13 kann man gut sehen, wie ausgeprägt die Interphase (die mittlere Phase) beim SP und Blutplasma ist. Dies ist auf den wesentlich höheren Proteingehalt im SP und Blutplasma zurückzuführen. Im Seminalplasma geht man beispielsweise von einem Proteingehalt von ca. 60-80 g/l aus (Mann *et al.*, 1981). Daher ist die Interphase durch die denaturierten Proteine und Zelltrümmer nach Zugabe der Lösungsmittel sehr ausgeprägt. Dies erschwerte die Gewinnung der unteren organischen Phase erheblich, wenn Chloroform und Methanol im gleichen Volumenverhältnis wie die wässrige Phase eingesetzt wurde. Um die Extraktion zu optimieren, wurden daher die Einflüsse verschiedener Volumina von Chloroform getestet. Es zeigte sich, dass die Lipidextraktion aus diesen beiden Systemen (SP

Ergebnisse

und Blutplasma) erheblich erleichtert werden kann, wenn die Extraktion mit einem höheren Volumen an Chloroform durchgeführt wird. Allerdings ist es anschließend ratsam, die gewonnene organische Phase nach der Extraktion einzuengen, um Verdünnungseffekte durch das Mehr an Chloroform zu reduzieren. Die optimierten Schritte der Extraktion sind in

Abb. 14 dargestellt.

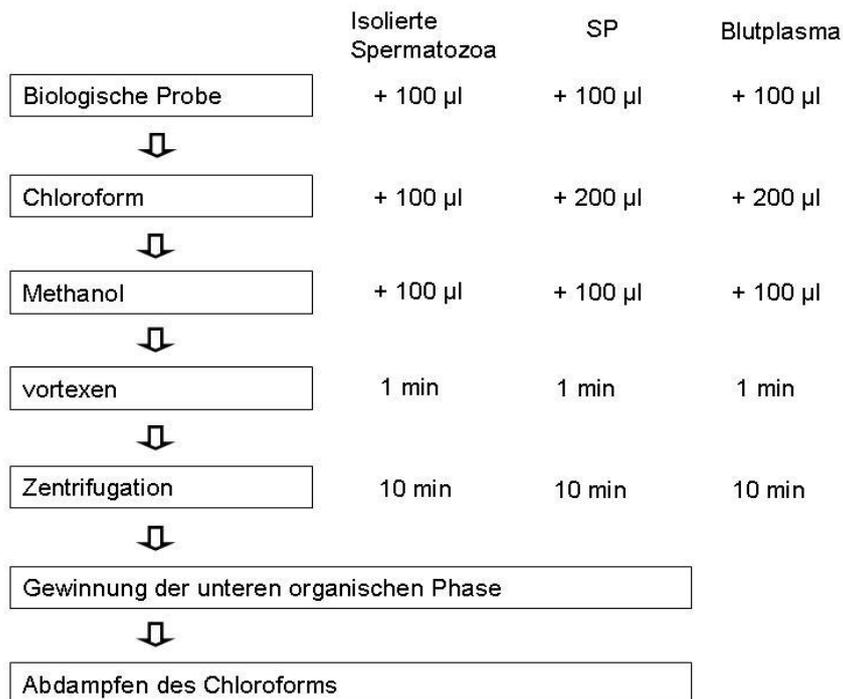


Abb. 14: Flußschema zur Lipidextraktion von Spermien, SP und Blutplasma.

Überblick der optimierten Teilschritte zur möglichst vollständigen Lipidextraktion der drei relevanten biologischen Systeme. Die jeweilige Probe wird im angegebenen Verhältnis mit Methanol und Chloroform versetzt. Anschließend wird für 1 min gemischt und 10 min zentrifugiert. Die isolierte untere Lipid-Chloroform-Phase kann dann eingedampft oder direkt für nachfolgende Messungen verwendet werden. Dieses Extraktionsverfahren bezieht sich auf PC und LPC, da diese beiden Spezies für die vorliegende Arbeit von zentraler Bedeutung sind.

Es ist somit ausreichend die isolierten Spermien in einem Verhältnis von 1:1:1 (wässrige Probe:Methanol:Chloroform) zu extrahieren. Beim SP und Blutplasma sollte dagegen mindestens die doppelte Menge an Chloroform verwendet werden. Nach der Extraktion muss das organische Extrakt eingeeengt werden, um eine ausreichend hohe Konzentration der relevanten Lipide zu erhalten.

4.3 Optimierte Lagerung von isolierten Spermien und SP

Es ist nicht immer möglich die Ejakulate unmittelbar nach Gewinnung zu analysieren. Um Einflüsse auf die Zusammensetzungen von Spermien und SP so gering wie möglich zu halten, wurden deshalb unterschiedliche Lagerbedingungen untersucht. Dies erfolgte zunächst mit isolierten humanen Spermien. Standardmäßig wurden 50 Millionen Spermien in 1 ml Medium pro Ansatz verwendet und unterschiedlich lang bei RT gelagert. Da bei dieser Bedingung davon ausgegangen werden kann, dass es zur Oxidation (durch den Luftsauerstoff) und somit zur Veränderung der Lipidzusammensetzung kommt, kann dieser Versuch als Positivkontrolle angesehen werden. Anschließend wurde extrahiert, wobei davon ausgegangen werden kann, dass es durch Zusatz der organischen Lösungsmittel zur Terminierung der meisten metabolischen Prozesse kommt. Typische Massenspektren sind in Abb. 15 gezeigt.

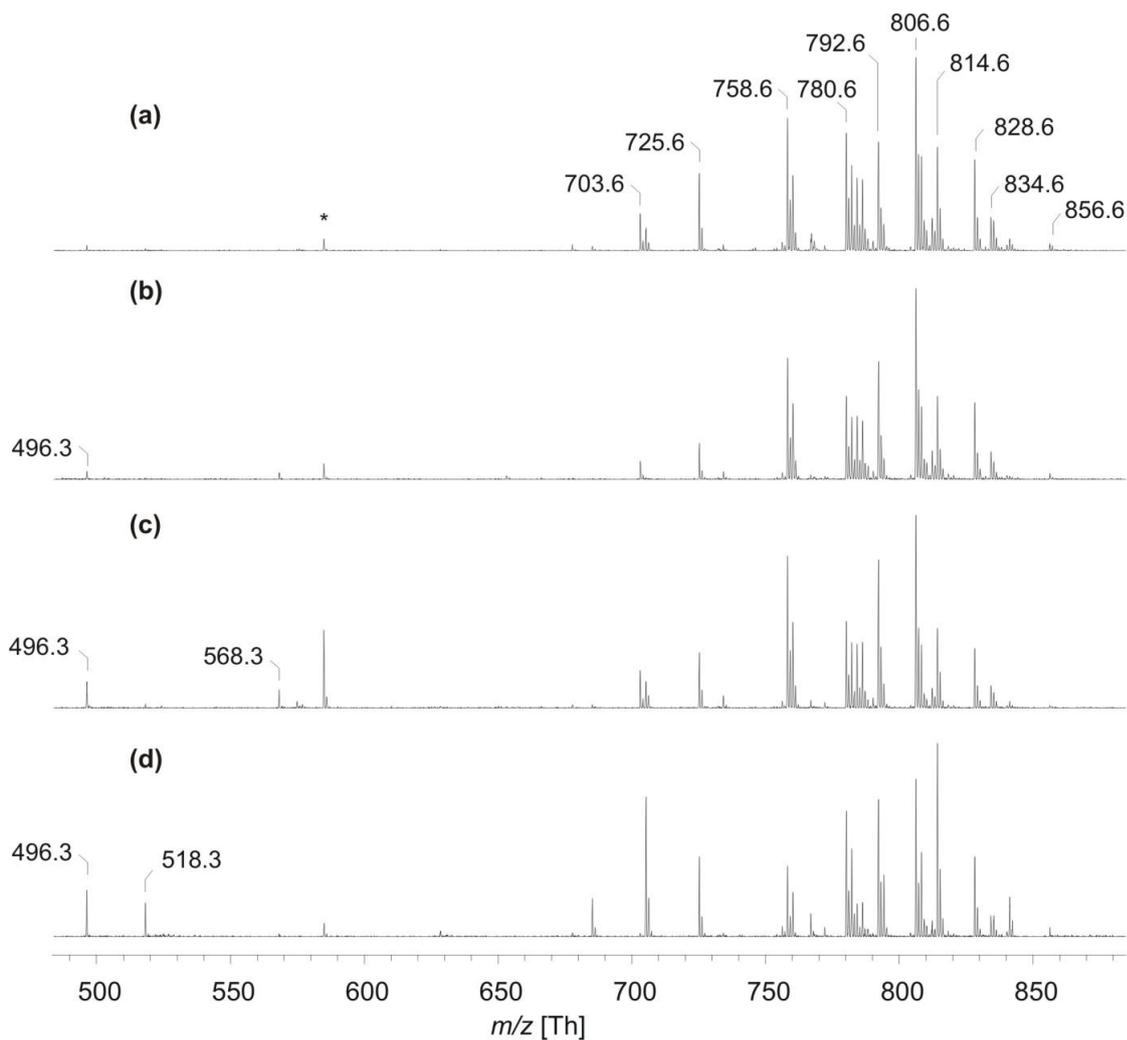


Abb. 15: Positiv-Ionen Massenspektren humaner Spermienextrakte nach unterschiedlich langer Lagerung der Spermien bei RT.

Alle Spektren wurden mit 9-AA im Positivionenmodus aufgenommen. Sämtliche Bedingungen blieben konstant; nur die Dauer der Lagerung der Spermien bei RT war unterschiedlich. Die Kontrolle (a) wurde direkt gemessen. Isolierte Spermien wurden nach 1 Tag (b), nach 5 Tagen (c) und nach 8 Tagen (d) extrahiert und anschließend gemessen. Ausgewählte Peaks sind mit den entsprechenden m/z -Werten gekennzeichnet. Der mit "*" gekennzeichnete Peak ($m/z = 585$) ist auf ein Clusterion der eingesetzten 9-AA-Matrix zurückzuführen.

Die Bedingungen aller Ansätze waren identisch, nur die Inkubationsdauer bei RT variierte. Um auch Extrembedingungen auszutesten, wurden die Proben bis zu 8 Tage gelagert. Die mit 9-AA im Positivionenmodus aufgenommenen MALDI-TOF Massenspektren sind sehr ähnlich. Die verschiedenen Lipide wie SM 16:0 ($m/z = 703.6$ und 725.6), PC 16:0/18:2 ($m/z = 758.6$ und 780.6) und PC 16:0/22:6 ($m/z = 806.6$ und 828.6) sind in allen Proben enthalten. Des Weiteren sind auch PC 16:0/18:1 ($m/z = 760.6$ und 782.6), GPC 16:0_{alkenyl}/22:5_{acyl} ($m/z = 792.6$ und 814.6) und PC 18:0/22:6 ($m/z = 834.6$ und 856.6) nachweisbar (Pyttel *et al.*, 2012). Der Fokus bei diesem Experiment (wie auch in allen nachfolgenden Experimenten) liegt auf LPC 16:0 ($m/z = 496.3$ und 518.3), da dies ein einfach nachweisbares

Ergebnisse

Oxidationsprodukt von PC ist, obwohl LPC auch durch PLA₂-Aktivität gebildet werden kann (Petković *et al.*, 2002). Man kann erkennen, dass mit steigender Inkubationsdauer die Menge an LPC 16:0 signifikant ansteigt. Neben LPC 16:0 kann bemerkenswerterweise auch LPC 22:6 ($m/z = 568.3$ und 590.3) detektiert werden, was darauf hindeutet, dass der ungesättigte Fettsäurerest nicht ausschließlich in *sn*-2 Position vorliegt. Sieht man von geringen Änderungen der Addukt-Intensitäten ab, so konnten außer LPC 16:0 keine zusätzlichen Peaks detektiert werden. Dies unterstreicht die Relevanz des LPC als Marker der Spermengüte.

Neben der Lagerung bei RT wurden die humanen Spermien auch für unterschiedliche Zeiten im Tiefkühlschrank bei -20°C gelagert. Die Rahmenbedingungen waren wie beim Versuch zur Lagerung bei Raumtemperatur. Typische Spektren sind in Abb. 16 dargestellt.

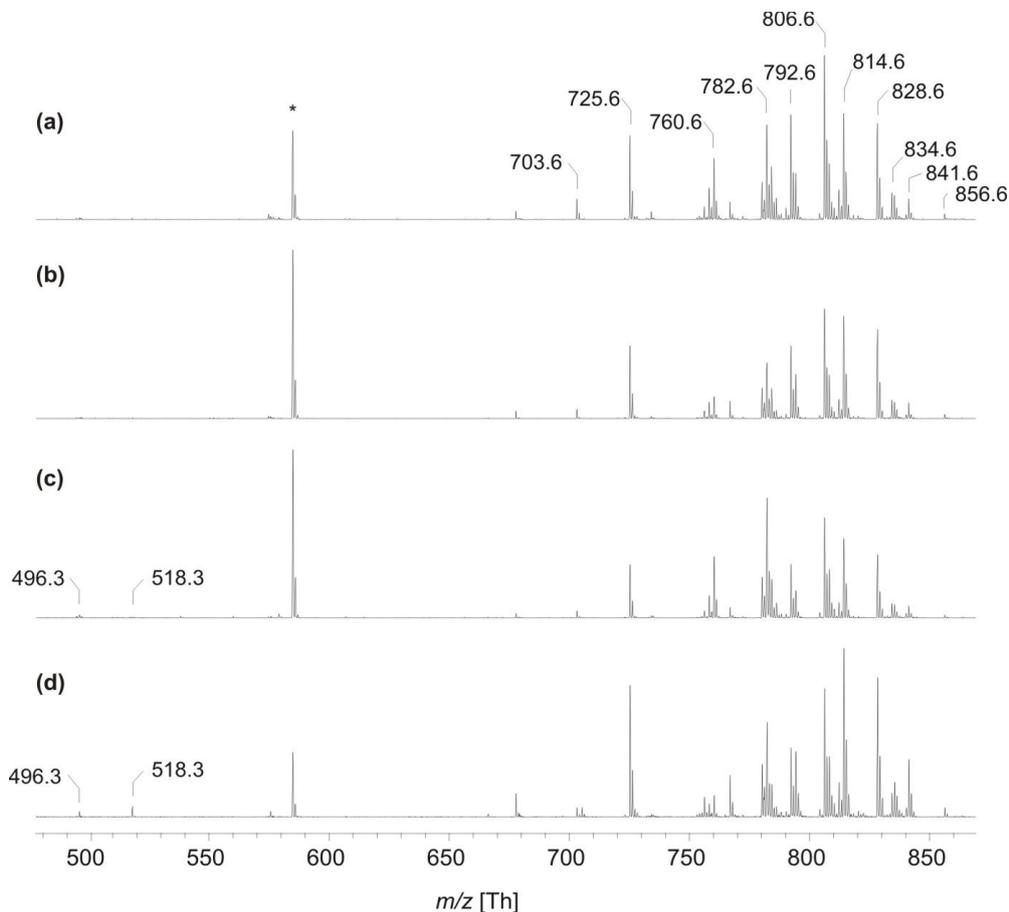


Abb. 16: Positiv-Ionen Massenspektren von humanen Spermienextrakten nach unterschiedlichen Lagerungszeiten der Spermien im TK bei -20°C .

Alle Spektren wurden mit 9-AA im Positivionenmodus aufgenommen. Die Lagerung humaner Spermien bei -20°C wurde unter sonst identischen Bedingungen über verschiedene Zeiten durchgeführt. Die Kontrollprobe (a) wurde direkt nach Isolation der Spermien untersucht. Die übrigen Proben wurden nach einer Inkubationsdauer von 4 Tagen (b), 8 Tagen (c) und 14 Tagen (d) extrahiert und dann sofort gemessen.

Die vier Spektren der Abb. 16 sind einander sehr ähnlich. In allen Proben konnten die gleichen Peaks wie bei den vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesen werden, wobei auch eine kleine Menge Seminolipid ($m/z = 841.6$) detektiert werden konnte (Schiller *et al.*, 2003). Vergleicht man Abb. 15 und Abb. 16 miteinander, so fällt jedoch auf, dass die Anteile der einzelnen PCs nicht identisch sind: So ist z.B. in Abb. 15 ein größerer Anteil PC 16:0/18:2 und in Abb. 16 von PC 16:0/18:1 offensichtlich. Es handelt sich um Spermien unterschiedlicher Probanden, so dass diese Unterschiede auf interindividuelle Schwankungen zurückzuführen sein dürften. Im Falle der Lagerung bei -20°C kann man über mehrere Tage keinen signifikanten Anstieg von LPC 16:0 ($m/z = 496.3$ und 518.3) erkennen. Erst nach 14 Tagen ist eine geringe Menge LPC 16:0 nachweisbar. Somit können selbst native Spermien mehrere Tage aufbewahrt werden.

Zusätzlich zur Lagerung der eigentlichen Spermien wurde die Lagerung von SP im Tiefkühlschrank (TK) bei -20°C untersucht. Ohne Extraktion wurde das von Spermien getrennte SP gelagert und das Experiment dann durch Extraktion der Lipide beendet. Ausgewählte Massenspektren sind in Abb. 17 gezeigt.

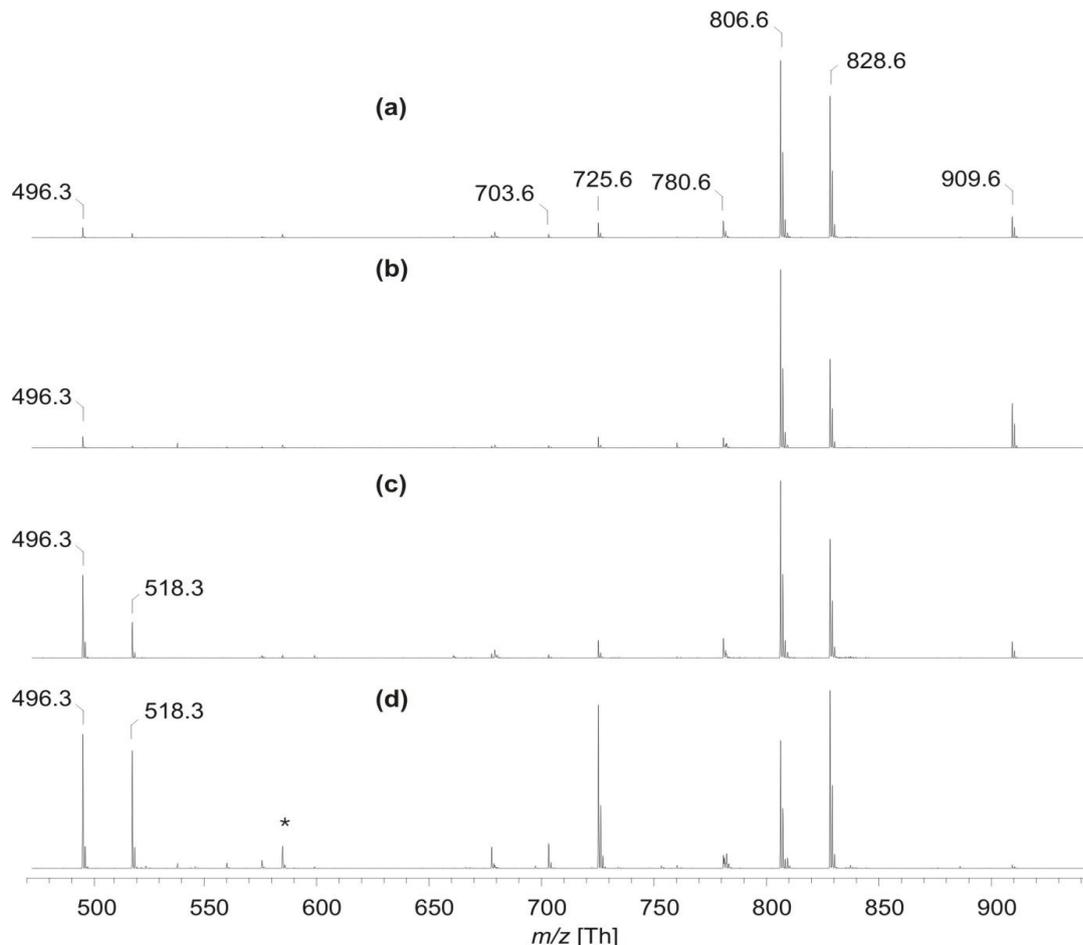


Abb. 17: Positiv-Ionen Massenspektren humaner SP nach Lagerung über unterschiedliche Zeiten bei -20°C.

Die gezeigten MALDI-TOF Massenspektren wurden mit 9-AA im Positivionenmodus aufgenommen. Die SP wurden direkt nach der Isolation als Kontrolle (a), 4 (b), 8 (c) und nach 14 Tagen (d) Lagerung bei -20°C extrahiert und gemessen. Der mit "*" gekennzeichnete Peak ist auf ein Clusterion der eingesetzten 9-AA-Matrix zurückzuführen.

In den Extrakten des SP konnte in allen Fällen LPC 16:0, SM 16:0, PC 16:0/18:2, PC 16:0/22:6 und TAG 54:2 detektiert werden (die entsprechenden Massen sind in Tabelle 6 zu finden). Bei Triacylglycerolen (ähnlich wie bei Diacylglycerolen und Cholesterylestern) werden immer nur die Na⁺ Addukte detektiert: Die Erklärung für diese Tatsache wurde unlängst von Gidden und Mitarbeitern (2007) gegeben: Es entstehen in der Gasphase zwar beide Addukte, allerdings weisen die H⁺ Addukte im Vergleich zu den Na⁺ Addukten eine geringere Stabilität auf und zerfallen auf dem Weg zum Massenanalysator unter Bildung von sogen. Diacylglycerol-Analoga sowie der Natriumsalze der entsprechenden Fettsäuren. Im Gegensatz zu den humanen Spermien ist beim SP schon nach wenigen Tagen ein signifikanter Anstieg von LPC 16:0 zu erkennen. Nach einer Lagerung von bis zu 14 Tagen kann man auch einen signifikanten Anstieg von SM 16:0 sehen. Schliesslich ist auch ein signifikanter

Abfall des TAG zu sehen, was auf eine Nutzung von TAG zur Energiegewinnung hindeutet. Es konnte somit gezeigt werden, dass der Einfluss der Lagerung auf isolierte Spermien nicht gleich dem von SP ist. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass im SP wesentlich mehr Enzyme enthalten sind, die einen signifikanten Einfluss auf die Lipidzusammensetzung haben. Offenbar werden diese Enzymaktivitäten auch durch den Einfrierprozess nicht vollständig terminiert.

4.4 Vergleich der Lipidzusammensetzung humaner Spermien von normalgewichtigen und übergewichtigen Spendern

In den letzten Jahren konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und verringerter männlicher Fertilität bewiesen werden (Kort *et al.*, 2006). Da die Fettleibigkeit zu einem systemischen oxidativen Stress führt (Ozata *et al.*, 2002) ist ein Beitrag von ROS wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit wird davon ausgegangen, dass ein reduziertes PC/LPC-Verhältnis einen potentiellen diagnostisch nützlichen Parameter für die Spermienqualität darstellt. Deswegen wurde nachfolgend die Lipidzusammensetzung humaner isolierter Spermien sowie der entsprechenden SP von Spendern mit einem normalen BMI ($\leq 25 \text{ kg/m}^2$) und fettleibigen Spendern mit einem hohen BMI ($> 25 \text{ kg/m}^2$) verglichen. Dafür wurden die Spermien vom SP abgetrennt, unter den oben geschilderten, optimierten Bedingungen extrahiert und die Lipidextrakte mittels MALDI-TOF MS charakterisiert. In der folgenden Abbildung sind zunächst die Spektren von einem potentiell gesunden, normalgewichtigen Spender gezeigt, wobei die Spektren im Positivionenmodus und Negativionenmodus mit 9-AA aufgenommen wurden.

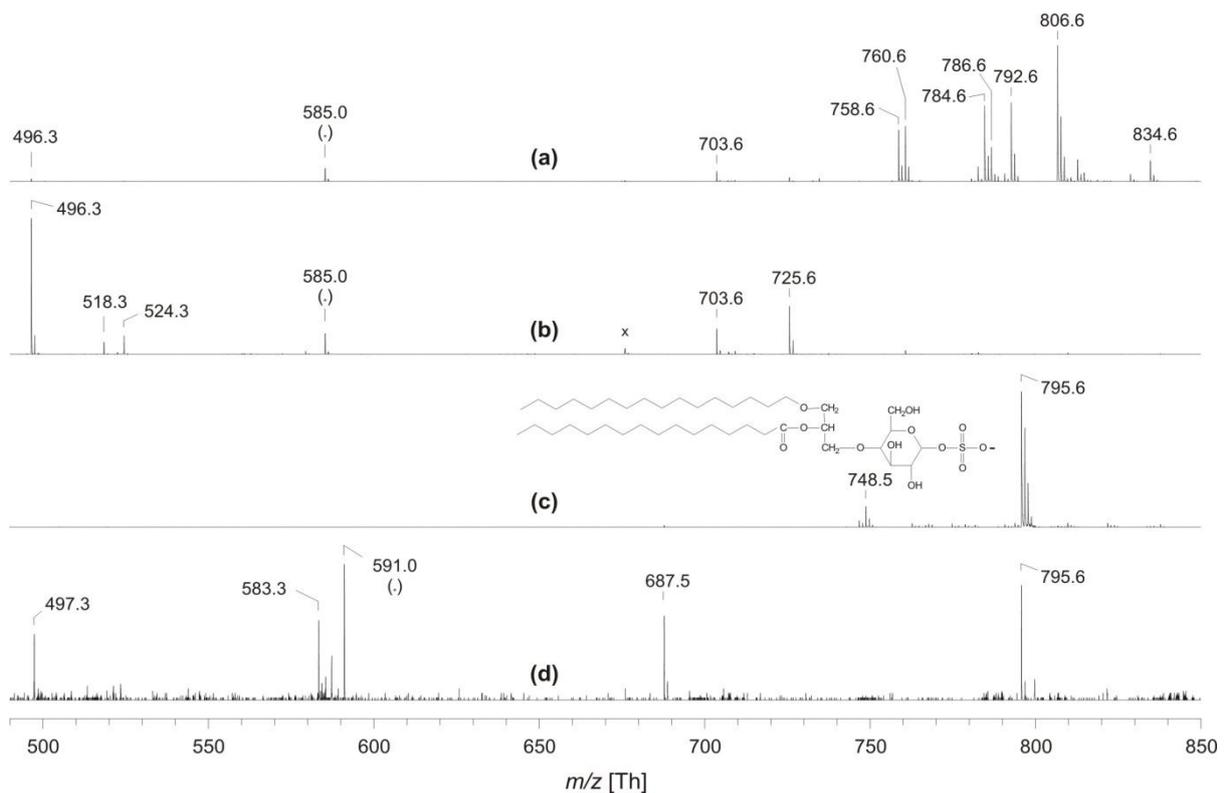


Abb. 18: Positiv-Ionen Massenspektren von Spermien- und SP-Extrakten eines normalgewichtigen Probanden.

Die MALDI-TOF Massenspektren wurden mit 9-AA im Positivionenmodus (a und b) und im Negativionenmodus (c und d) aufgenommen. Es wurden organische Extrakte von humanen Spermien (a und c) und dem entsprechenden SP (b und d) von einem gesunden, normalgewichtigen Spender (mit einem BMI < 25 kg/m²) untersucht. Der mit "x" markierte Peak entspricht einem Fragmentation von SM 16:0 (Verlust der Kopfgruppe). Die chemische Struktur des Seminolipids ($m/z = 795.6$) ist unter (c) dargestellt.

In der Abb. 18 wurden die MALDI-TOF Massenspektren der Extrakte humaner Spermien und des entsprechenden SP im Positiv- und im Negativionenmodus miteinander verglichen. Da es sich um einen normalgewichtigen Spender handelt, sind diese Spektren als Kontrollspektren für die nachfolgenden Untersuchungen anzusehen. Die Spektren wurden (aufgrund der damit erzielbaren höheren Sensitivität) alle mit 9-AA aufgenommen. Im Positivionenmodus konnten verschiedene PC-Spezies detektiert werden. Dazu gehören PC 16:0/18:2, PC 16:0/18:1, PC 18:0/18:3, PC 18:0/18:2, und PC 18:0/22:6 (die entsprechenden m/z -Werte und die Zuordnungen sind in Tabelle 6 aufgelistet). Es ist zu beachten, dass im Wesentlichen nur die H⁺ Addukte der einzelnen Lipide detektiert werden. Dies ist ein Vorteil für die Zuordnung der einzelnen Lipide und wahrscheinlich auf eine höhere Na⁺ Ionenaffinität von 9-AA (im Vergleich zu DHB) zurückzuführen. Vergleicht man im Positivionenmodus die Extrakte der humanen Spermien und des SP (Abb. 18 a und b), erkennt man drei deutliche Unterschiede: Das SP enthält im Vergleich zu den Spermien nur sehr kleine Mengen an Phosphatidylcholinen. Dafür

aber viel größere Mengen an LPC, besonders LPC 16:0. Neben LPC 16:0 konnte auch LPC 18:0 detektiert werden. Des Weiteren kann man sehen, dass im SP eine viel größere, relative Konzentration an SM 16:0 vorliegt (Pyttel *et al.*, 2012).

Im Negativionenmodus (Spermienextrakte) wurden kleine Mengen an GPE 16:0_{alkyl}/22:6_{acyl} ($m/z = 748.5$) detektiert, dem einzigen nachweisbaren PE. Demgegenüber steht ein sehr intensiver Peak, der von Seminolipid (SL) ($m/z = 795.6$) herrührt (Goto-Inoue *et al.*, 2009). Die chemische Struktur des detektierten Seminolipids ist ebenfalls in Abb. 18 dargestellt. Im Extrakt des SP (Abb. 18 d) ist dagegen nur ein kleines Signal des SL nachweisbar. Aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses ist die absolute Konzentration an SL aber sicher sehr gering. Des Weiteren konnte SM 16:0 ($m/z = 687.5$) nach Verlust einer Methylgruppe nachgewiesen werden (Fuchs *et al.*, 2009).

In Abb. 19 sind die im Positivionenmodus aufgenommenen Massenspektren der Extrakte humaner Spermien (a) und des SP (b) von einem adipösen Spender gezeigt. Aufgrund der damit erzielbaren höheren Empfindlichkeit wurden auch diese Spektren mit 9-AA aufgenommen.

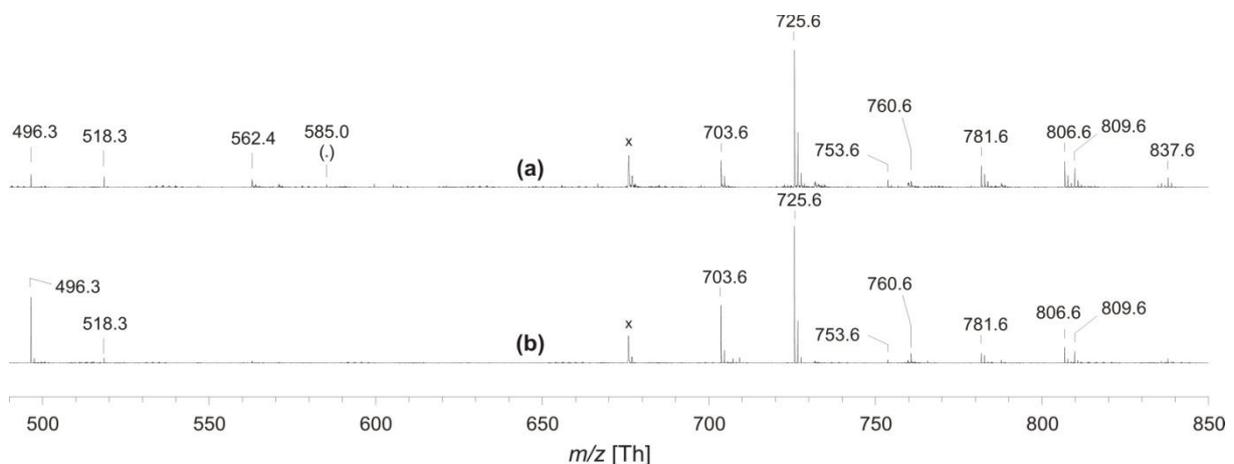


Abb. 19: Positiv-Ionen Massenspektren humaner Spermien- bzw. SP-Extrakte eines adipösen Spenders.

Im Positivionenmodus mit 9-AA aufgenommene MALDI-TOF Massenspektren. Untersucht wurden organische Extrakte von humanen Spermien (a) und dem entsprechenden SP (b) eines männlichen adipösen Spenders ($BMI > 35 \text{ kg/m}^2$). Der mit (*) markierte Peak entspricht einem in der Gasphase entstandenen Matrix-Oligomer ($m/z = 585.0$). Der Peak, der mit "x" gekennzeichnet ist, ist ein Fragment-Ion von SM 16:0, das durch Verlust einer Methylgruppe entsteht.

Die beiden aufgenommenen Spektren sind sehr ähnlich. Es sind alle typischen Peaks in beiden Proben in ähnlichen Anteilen vorhanden. Dazu gehören LPC 16:0, SM 16:0, SM 18:0, SM 20:0, SM 22:0 und SM 24:0 sowie PC 16:0/22:6 (die entsprechenden m/z -Werte und die Zuordnungen sind in Tabelle 6 aufgelistet).

LPC 16:0 ist im SP mit einer wesentlich höheren Konzentration detektierbar als im Spermienextrakt, was die früheren Untersuchungen bestätigt. Dafür wurde nur im Spermienextrakt SM 24:0 detektiert. Ansonsten ist die Lipidzusammensetzung identisch.

Vergleicht man die Spektren des normalgewichtigen Spenders mit dem adipösen Spender, sind zwei signifikante Unterschiede offensichtlich: Bei den Spendern mit hohem BMI ist ein erhöhter Gehalt an SM nachweisbar. Neben SM 16:0 konnten zusätzlich auch SM 18:0, SM 20:0, SM 22:0 und SM 24:0 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine signifikant geringere Menge an PC, aber eine erhöhte Menge an LPC detektiert. Das PC/LPC-Verhältnis zeigt somit eindeutig die veränderte Lipidzusammensetzung zwischen den normalgewichtigen und den adipösen Männern. Diese veränderte Lipidzusammensetzung korreliert auch mit ausgewählten klinischen Parametern. Dazu zählt zum Beispiel eine verminderte progressive Spermienmotilität mit steigendem BMI. All diese Daten sind der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab 8: Klinische Parameter unterschiedlicher Probanden.

Übersicht über klinische Parameter und die entsprechenden PC/LPC-Verhältnisse von isolierten Spermien normalgewichtiger, übergewichtiger und adipöser Spender. Die klinischen Parameter wurden entsprechend der Empfehlung der WHO (2010) bestimmt. Die Lipidzusammensetzung (PC/LPC-Verhältnis) wurde mittels MALDI-TOF MS bestimmt.

	Normalgewichtige Männer	Übergewichtige Männer	Adipöse Männer	
			Subgruppe 1	Subgruppe 2
Alter (Jahre)	27 ± 7	35 ± 8	46 ± 11	44 ± 8
BMI (kg/m ²)	22.5 ± 1.7	27.3 ± 1.6	31.3 ± 1.4	46.3 ± 10.8
Spermienbeweglichkeit	58.2 ± 12.9	51.2 ± 15.6	48.6 ± 7.8	41.4 ± 15.4
Vitalität	79 ± 8.3	71.1 ± 19.1	67.1 ± 10.7	69.9 ± 19.4
PC/LPC	23 (7-60)	46 (7-71)	35 (20-172)	4 (1-7)

4.5 Vergleich muriner epididymaler Spermien aus Cauda und Caput

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Lipidzusammensetzung muriner Spermien in verschiedenen Reifestadien der Epididymis untersucht. Diese Untersuchungen waren von Interesse, da sich nach der Spermienbildung (Spermiogenese) im Testis (Leblond *et al.*, 1952) verschiedene Reifungsprozesse in der Epididymis (Yanagimachi *et al.*, 1994), die man grob in Cauda und Caput gliedern kann, anschließen. Während der Reifung erfolgen umfassende Umbauprozesse der Spermienmembran, die auch die Phospholipide betreffen. Wie genau sich die Lipidzusammensetzung der Membran verändert, ist jedoch noch weitgehend unbekannt und soll in diesem Teil der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Es wurde die murine Epididymis untersucht, da die Maus als Modellorganismus viele Vorteile im Vergleich zu größeren Tieren oder gar zum Menschen besitzt (Bellve *et al.*, 1977; Rusell *et al.*, 1990). Mäuse können mit einfachen Methoden gezüchtet werden, wobei die Kosten für die Tierhaltung vergleichsweise niedrig sind. Für die Analyse der Lipidzusammensetzung ist es auch ein großer Vorteil, dass die Mäuse durch eine sehr kurze Generationsdauer charakterisiert sind und Einflüsse individueller Lebensführung (z.B. Unterschiede bei der Ernährung) nahezu ausgeschlossen werden können. Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurde zunächst die Epididymis der Maus entnommen und in ihre Teile zerlegt. Es folgte die Isolierung der Spermien aus dem Cauda und Caput. Die Lipide der Spermien konnten dann extrahiert und wie oben beschrieben mittels MALDI-TOF MS charakterisiert werden. Die entsprechenden Spektren sind in der folgenden Abb. 20 zu sehen.

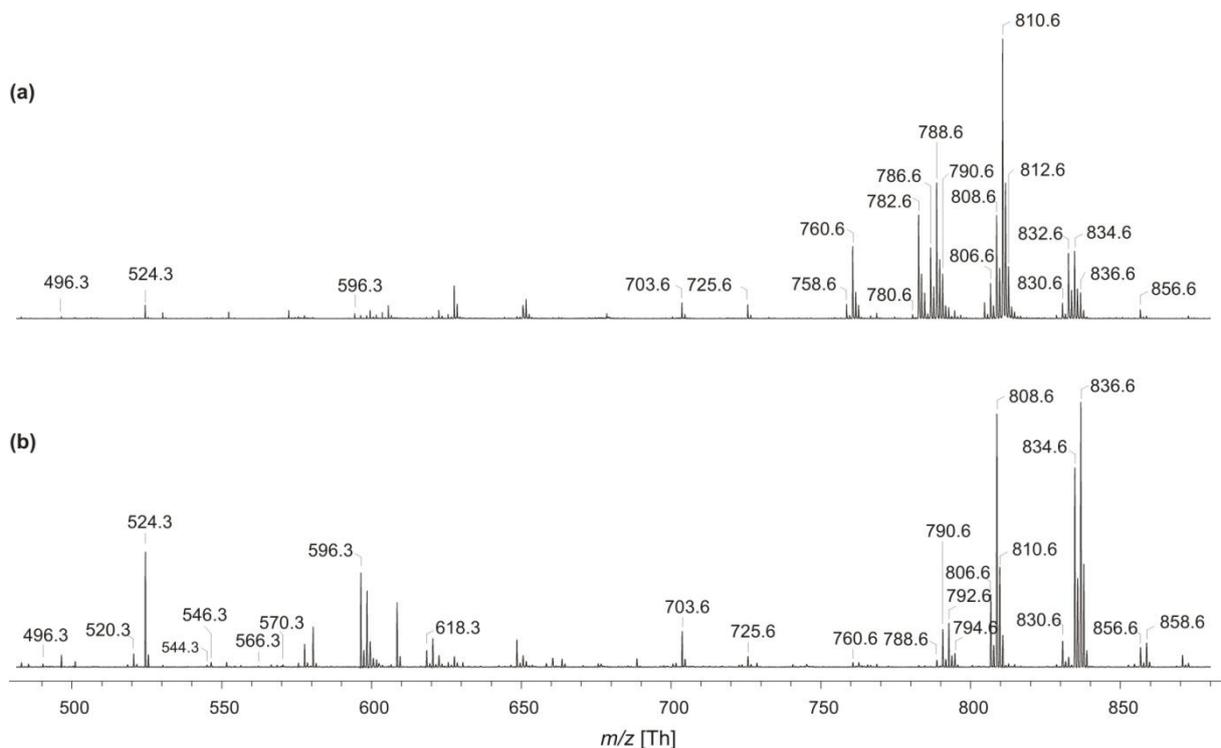


Abb. 20: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren der Lipidextrakte von aus muriner Epididymis isolierten Spermien.

Beide Spektren wurden mit DHB als Matrix aufgenommen. Die untersuchten Spermienextrakte stammen aus dem Caput (a) und Cauda (b) der Epididymis. Die Zuordnungen sämtlicher Peaks sind in Tab. 6 zu finden.

Obwohl (wie eingangs dargelegt) die Anwendung von 9-AA Vorteile bietet, wurden beide Spektren mit DHB als Matrix aufgenommen. Die Anwendung von DHB erklärt sich damit, dass die Lipidzusammensetzung der Mäusespermien noch weitgehend unbekannt ist. Somit musste sicher gestellt sein, dass tatsächlich alle Lipide detektiert werden können. Trotz der mit 9-AA erzielbaren höheren Empfindlichkeit, ist die Detektierbarkeit aller Lipidklassen mit 9-AA jedoch nicht gewährleistet: So werden z.B. Triacylglycerole (und andere apolare Lipide) mit 9-AA nicht detektiert, wohl aber mit DHB (Dannenberger *et al.*, 2010).

Die Lipidzusammensetzungen der Spermienextrakte von Caput (a) und Cauda (b) unterscheiden sich charakteristisch. Im Spermienextrakt aus dem Caput ist das dominante Signal das des PC 18:0/20:4 ($m/z = 810.6$ und 832.6), gefolgt von PC 18:0/18:1 ($m/z = 788.6$ und 810.6) sowie PC 18:0/18:2 ($m/z = 786.6$ und 808.6). In moderater Menge wurden auch PC 16:0/18:1, PC 18:0/22:6, PC 16:0/22:6 und PC 16:0/18:2 detektiert. Alle anderen Lipide lagen in wesentlich geringen Konzentrationen vor. Die beobachteten m/z -Werte und die Zuordnungen zu den entsprechenden Lipiden sind in Tabelle 6 aufgelistet. Im Vergleich zum Spermienextrakt aus der Caput wurden im Extrakt aus dem Cauda signifikant mehr

Lyso-Verbindungen detektiert, darunter bemerkenswerterweise auch Formyl-LPC 22:6 ($m/z = 596.3$ und 618.3). Dieses Formyl-LPC entsteht ausschließlich bei der Oxidation vom Plasmalogen (Fuchs *et al.*, 2007) PC 16:0_{alkenyl}/22:6_{acyl} ($m/z = 790.6$ und 812.6). Diese Verbindung ist das einzige Plasmalogen, das in murinen Spermien detektiert werden konnte. In den humanen Spermien sind nur sehr geringe Mengen an Plasmalogenen enthalten (Leßig *et al.*, 2004), wohingegen in den Spermien von Wiederkäuern z.B. Bullen eine große Menge an Plasmalogenen enthalten ist; die Menge an Plasmalogenen übertrifft sogar die der "klassischen" Diacyl-Phospholipide (Schiller *et al.*, 2003).

Es konnte LPC 16:0, LPC 18:2, LPC 18:0, LPC 20:4 und LPC 22:5 detektiert werden (Die beobachteten m/z -Werte und die Zuordnungen zu den einzelnen Lipiden sind in Tabelle 6 aufgelistet). Sowohl im Extrakt aus dem Cauda, als auch aus dem Caput wurde SM 16:0 detektiert. Insgesamt konnten in dem Extrakt aus dem Caput wesentlich mehr PC-Spezies und im Cauda mehr LPC-Spezies nachgewiesen werden. Das Formyl-LPC und das entsprechende Plasmalogen konnte jedoch in beiden Extrakten detektiert werden.

Um eindeutig alle Peaks, wie beispielsweise $m/z = 810.6$ (es könnte sich um das Protonaddukt von PC 18:0/20:4 oder das Na^+ Addukt von PC 18:0/18:1 handeln, da diese beiden Spezies isobar sind) oder auch $m/z = 806.6$ den entsprechenden Lipiden zuordnen zu können, wurden dieselben Extrakte nochmals mit Cäsium-gesättigter DHB gemessen (Schiller *et al.*, 2001). Die Zugabe von CsCl zur Matrix ist das Mittel der Wahl, da es aufgrund des hohen Atomgewichtes von Cäsium zu einer starken Verschiebung aller Peaks kommt, so dass nur noch Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung relevant sind, da sicher ist, dass es sich um die Cs^+ Addukte handelt. Ein weiterer Vorteil ist, dass Cäsium ein Reinelement ist, d.h. nur ein einziges Isotop besitzt. Die resultierenden Spektren sind in Abb. 21 gezeigt.

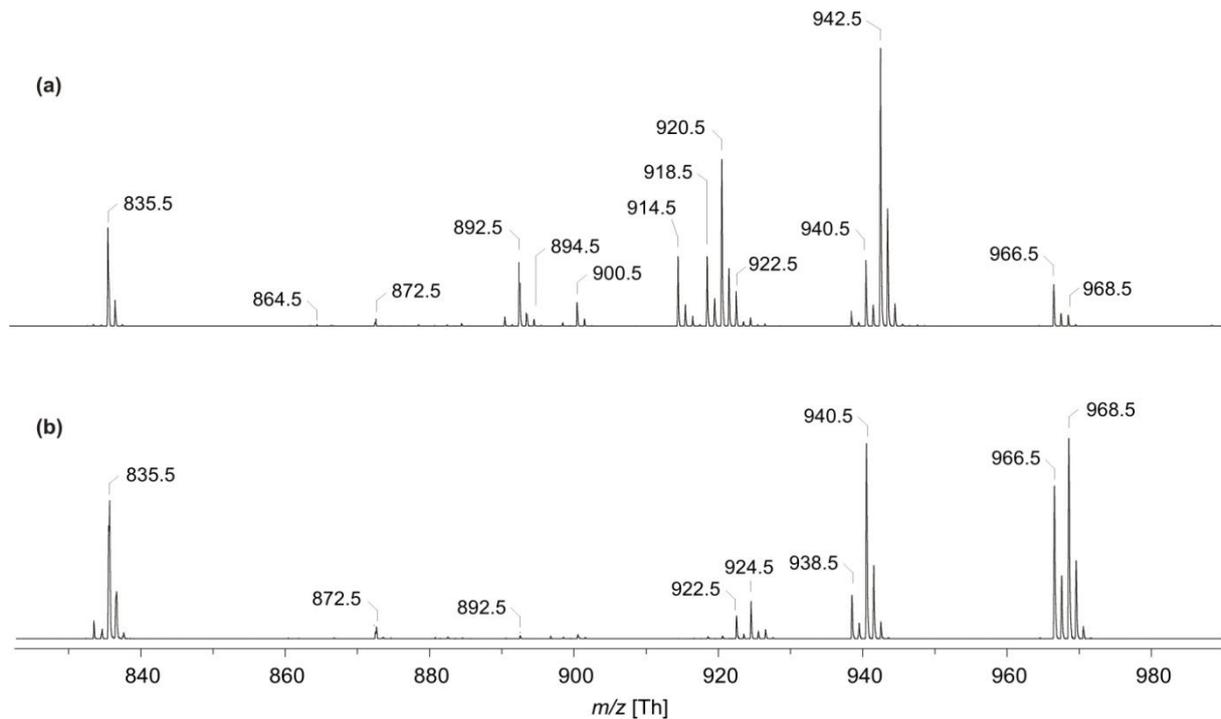


Abb. 21: Positiv-Ionen Massenspektren muriner Spermienextrakte der Epididymis unter Verwendung einer CsCl-gesättigten DHB-Matrix.

Es handelt sich um die gleichen Spermienextrakte aus Caput (a) und Cauda (b), die bereits in Abb. 20 gezeigt wurden. Durch die gezielte Generierung von Cs^+ Addukten kann hier jedoch die Fettsäurezusammensetzung eindeutig bestimmt werden.

Cäsium hat ein Atomgewicht von 132.9 amu. Daher verschieben sich die Peaks aller Phospholipide charakteristisch um 132.9 amu (bezogen auf das Neutrallipid) und können damit sicher den Cs^+ Addukten zugeordnet werden. Auf diese Weise können Überlagerungen verschiedener Addukte und Lipiden mit unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung ausgeschlossen werden.

Folgende nicht eindeutig zuordenbare Peaks konnten in Gegenwart eines Überschusses von Cs^+ Ionen eindeutig identifiziert werden: Im Spermienextrakt des Caputs wurde ein intensiver Peak bei $m/z = 810.6$ detektiert. Dieser Peak könnte sowohl mit dem Na^+ Addukt von PC 18:0/18:1 als auch mit dem Protonaddukt von PC 18:0/20:4 zu erklären sein. In Gegenwart eines Überschusses an CsCl kann das PC 18:0/18:1 jedoch eindeutig $m/z = 920.5$ und PC 18:0/20:4 $m/z = 942.5$ zugeordnet werden. Da in Gegenwart von CsCl beide Peaks eindeutig detektierbar sind, sind in dem Lipidgemisch tatsächlich beide PCs enthalten und der (im Spektrum ohne CsCl) nachweisbare Peak bei $m/z = 810.6$ entspricht einer Überlagerung beider Spezies. Nicht eindeutig ist im Spermienextrakt aus dem Cauda auch $m/z = 806.6$, da dieser Peak entweder dem Na^+ Addukt von PC 18:0/18:3 oder dem Protonaddukt

von PC 16:0/22:6 zugeordnet werden kann. Das Cs⁺ Addukt von PC 18:0/18:3 wäre entsprechend bei $m/z = 916.5$ und von PC 16:0/22:6 bei $m/z = 938.5$ zu detektieren. Durch die Messung in Gegenwart von Caesium kann sichergestellt werden, dass es sich ausschließlich um PC 16:0/22:6 handelt. Schließlich konnte der Peak bei $m/z = 782.6$ (nach Zugabe von CsCl) sicher einem Gemisch aus PC 16:0/18:1 und PC 2×18:2 zugeordnet werden. Beide PCs sind in relativ großer Menge im Spermienextrakt des Caputs enthalten. Des Weiteren konnte $m/z = 784.6$ des Spermienextraktes aus dem Caput dem PC 16:0/18:0 zugeordnet werden. Der Peak bei $m/z = 790.6$ aus dem Spermienextrakt aus dem Caput und Cauda konnte im Caput dem PE 18:0/20:4 bzw. GPC 16:0_{alkenyl}/22:6_{acyl} und im Cauda ganz überwiegend GPC 16:0_{alkenyl}/22:6_{acyl} zugeordnet werden. Zuletzt wurde mit DHB im Spermienextrakt aus dem Cauda $m/z = 808.6$ detektiert, welches dem Na⁺ Addukt von PC 18:0/18:2 oder dem Protonaddukt von PC 16:0/22:5 entsprechen könnte. Hier konnte anhand der Cs⁺ Addukte gezeigt werden, dass es keine Überlagerung der beiden isobaren Verbindungen gab, sondern der Peak bei $m/z = 808.6$ ausschließlich von PC 16:0/22:5 herrührt. Die m/z -Werte der in den einzelnen Proben enthaltenen Phospholipide sowie deren Zuordnungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 9: Zuordnung der in den Caput und Cauda detektierten Phospholipide.

Alle Peaks wurden im Positiv-Ionenmodus detektiert. Neben [M+H]⁺ und [M+Na]⁺ sind auch die [M+Cs]⁺ Addukte sowie deren Zuordnungen gezeigt.

m/z [M+H] ⁺	m/z [M+Na] ⁺	m/z [M+Cs] ⁺	Zuordnung
760.6	782.6	892.5	PC 16:0/18:1
762.6	784.6	894.5	PC 16:0/18:0
768.6	790.6	900.5	PE 18:0/20:4
782.6	804.6	914.5	PC 18:2/18:2 oder PC 16:0/20:4
784.6	806.6	916.5	PC 18:0/18:3 oder PC 18:1/18:2
786.6	808.6	918.5	PC 18:0/18:2
788.6	810.6	920.5	PC 18:0/18:1
790.6	812.6	922.5	PC 16:0 _{alkenyl} /22:6 _{acyl}
806.6	828.6	938.5	PC 16:0/22:6
808.6	830.6	940.5	PC 16:0/22:5
810.6	832.6	942.5	PC 18:0/20:4

In der Tabelle ist zu sehen, dass es teilweise auch m/z -Werte gibt, die nicht eindeutig einem bestimmten Lipid zugeordnet werden können. Dazu gehört beispielsweise $m/z = 784.6/806.6$. Diese Massen könnten sowohl PC 18:0/18:3 als auch PC 18:1/18:2 entsprechen.

Durch gezielte Generierung der Cs^+ Addukte können somit nahezu alle Peaks eindeutig den entsprechenden Lipiden zugeordnet werden und die Lipidzusammensetzung beider Extrakte eindeutig bestimmt werden. Neben dieser Methode hätte man die Peaks natürlich auch mittels MS/MS oder eines PLA_2 -Verdau identifizieren können. Bei der Fragmentierung der Mutterionen mittels MS/MS entstehen sehr spezifische Fragmente (insbesondere die Peaks der freien Fettsäuren), durch die Rückschlüsse auf die Struktur der eingesetzten Lipide gezogen werden können (Brugger *et al.*, 1997). Auch ein Phospholipase-Verdau ist zur eindeutigen Identifizierung geeignet: Da das Enzym Phospholipase A_2 zu mäßigem Preis kommerziell verfügbar ist und den Fettsäurerest in *sn*-2 Position regiospezifisch spaltet, ist eine bequeme Differenzierung der Fettsäurereste in *sn*-2 Position möglich. Allerdings beschränken diese zusätzlichen Untersuchungen den Probendurchsatz und wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Zusammengefasst konnten signifikante Unterschiede in der Lipidzusammensetzung der Spermienextrakte aus dem murinen Caput und dem Cauda nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Reifestadien können anhand der Lipidzusammensetzung ebenfalls differenziert werden.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist der Analytik der Lipidzusammensetzung von Spermien gewidmet, weshalb sowohl analytische wie auch zellbiologische Aspekte eingeflossen sind. Die Beschränkung der Untersuchungen auf die Lipide der Spermien ist damit begründet, dass Lipide ubiquitär vorkommende Verbindungen sind und deshalb auch für den Vergleich unterschiedlicher Spezies (z.B. Mensch und Maus) anwendbar sind. Dieser Vorteil wäre für z.B. Proteine nicht gegeben, da Proteine in der Regel speziesabhängig einen bestimmten Antikörper erfordern. Die humanen Spermien und das entsprechende SP waren von besonderer Bedeutung, weshalb fast alle Experimente ausschließlich mit diesen durchgeführt wurden. Ziel der Arbeit war es zu klären, ob Zusammenhänge zwischen Spermienqualität und bestimmten Krankheiten, wie z.B. Diabetes und Adipositas, die in den Industrienationen immer häufiger vorkommen, existieren. Daher war es in dieser Arbeit von besonderem Interesse die Spermien von normalgewichtigen Probanden und fettleibigen bzw. adipösen Probanden im Hinblick auf ihre Lipidzusammensetzung zu vergleichen. Weiterhin sollten verschiedene Entwicklungsstadien von Spermien in der Epididymis untersucht werden. Da dafür die Epididymis entfernt und zerstört werden musste, konnten dafür keine humanen Proben eingesetzt werden. Deshalb wurden Mäuse als Modellorganismus herangezogen und die einzelnen Reifestadien von murinen Spermien untersucht. Für die Analyse der Lipide und Lipidgemische sollte die MALDI-TOF Massenspektrometrie eingesetzt werden: Dieses Verfahren ist (im Vergleich zu anderen MS-Verfahren) eine sehr schnelle und einfache Methode zur Analytik komplexer Lipidgemische. Aufgrund der Schnelligkeit, dem geringen Aufwand, der hohen Automatisierbarkeit und der erzielbaren, extremen Empfindlichkeit gewinnt diese Methode immer größere Bedeutung, u. a. auch in der klinischen Diagnostik (Cho *et al.*, 2013; Page *et al.*, 2002).

5.1 Optimierung der MALDI-TOF MS Methodik für humane Spermien

Mit der Entdeckung der physiologischen Relevanz von Lipiden (insbesondere als "second messenger Moleküle") wurden diese in den letzten Jahren immer interessanter, wobei sich (als Konsequenz von Proteomics, Genomics und Metabolomics) nun auch der Begriff „Lipidomics“ etabliert hat (Wenk *et al.*, 2005). "Lipidomics" ist der Oberbegriff für die Charakterisierung von Fettsäuren, Lipiden und Phospholipiden sowie ihrer metabolischen Produkte in biologischen Systemen (Kishimoto *et al.*, 2001). Um Lipide möglichst sensitiv detektieren und ihre Struktur sicher aufklären zu können, etablierten sich im Kontext mit verschiedenen "Lipidomics"-Initiativen verschiedenste Methoden zur Lipidanalyse, wobei hier nur auf chromatographische (Fuchs *et al.*, 2011) und massenspektrometrische (Murphy *et al.*, 2011) Verfahren eingegangen werden soll. Aufgrund ihrer extrem hohen Sensitivität (und einiger zusätzlicher Vorteile) ist die Massenspektrometrie in heutiger Zeit das Mittel der Wahl für die Analytik von Lipiden. Neben dem Massenanalysator (z.B. TOF oder Ionenfalle) ist das Verfahren, das zur Generierung der Ionen eingesetzt wird, entscheidend für die Anwendbarkeit der MS auf ein bestimmtes System. Auch bei den Ionisationsverfahren gab es deshalb eine rasante Entwicklung, was die Einführung von Verfahren wie ESI (Elektrospray-Ionisation) (Pulfer and Murphy, 2003), APCI (chemische Ionisation bei Atmosphärendruck) und MALDI-MS (Schiller *et al.*, 2007; Hillenkamp *et al.*, 1991) zeigt, wobei die Erfinder der ESI- und der MALDI-MS 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt wurden. ESI-MS ist zweifellos das am häufigsten eingesetzte MS-Verfahren für die Lipidanalytik (Blanksby and Mitchell, 2010), da es universell einsetzbar ist und einfach mit Verfahren der Flüssigkeitschromatographie gekoppelt werden kann. Trotzdem hat sich in den letzten Jahren MALDI-(TOF) MS als ein mögliches, alternatives Verfahren herauskristallisiert (Schiller *et al.*, 2004; Schiller *et al.*, 2007). Dies rührt nicht zuletzt von der Tatsache her, dass es sich beim MALDI um ein Desorptionsverfahren handelt, das auch für die Analyse komplexer Gewebe anwendbar ist und die Aufnahme orts aufgelöster Massenspektren ("MS-Imaging") erlaubt (McDonnall *et al.*, 2007; Sparvero *et al.*, 2012).

MALDI-MS (oft in Kombination mit einem TOF Massenanalysator) ist eine sehr schnelle, einfache und empfindliche Methode (Schiller *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 2010). Zudem hat sich auch gezeigt, dass die Genauigkeit und die

Reproduzierbarkeit der MALDI-TOF MS Daten mit den Daten von ESI-MS Messungen vergleichbar sind (Sun *et al.*, 2008).

Soll die Lipidzusammensetzung einer biologischen Probe bestimmt werden, ist es in aller Regel (insbesondere für quantitative Untersuchungen) notwendig die Probe zuvor zu extrahieren und so die Lipide anzureichern. Eine oft verwendete und auch in dieser Arbeit ausschließlich eingesetzte Extraktionsmethode ist die Bligh & Dyer Extraktion, wobei Chloroform/Methanol Gemische eingesetzt werden. Dabei reichern sich die Lipide nahezu quantitativ in der Chloroformphase an, während das Methanol fast vollständig in die wässrige Phase übergeht, die Lipide verdrängt und so die Lipidausbeute verbessert. Eine Extraktion nur mit Chloroform führt zu wesentlich niedrigeren Ausbeuten (nicht publizierte Arbeiten). Des Weiteren ist für die MALDI-MS Analytik die Auswahl der Matrix entscheidend. Aufgrund ihrer sauren bzw. basischen Eigenschaften wurden in dieser Arbeit ausschließlich DHB und 9-AA verwendet. DHB ist auch unter Hochvakuumbedingungen (ca. 2×10^{-7} mbar in der Ionenquelle) völlig stabil und verfügt über eine Carboxylgruppe, die die Bildung von positivgeladenen Quasi-Molekülonen begünstigt. Im Gegensatz zu vielen anderen Matrices, die nur in einem Polaritäts-Modus anwendbar sind, ist es mit 9-AA möglich, Spektren hoher Qualität und exzellenter Sensitivität sowohl im positiven wie auch im Negativionenmodus aufzunehmen (Sun *et al.*, 2008). Durch die Basizität von 9-AA ($pK \approx 9.9$) (Teuber *et al.*, 2010) können insbesondere Spektren im negativen Ionenmodus mit hoher Empfindlichkeit aufgenommen werden (Sun *et al.*, 2008). Zudem liefert 9-AA nur einen sehr geringen "Matrixhintergrund" (Schiller *et al.*, 2007), was insbesondere für die Detektion "kleiner" Moleküle günstig ist. 9-AA generiert im positiven Ionenmodus fast ausschließlich Protonaddukte, was die Identifikation der einzelnen Komponenten eines komplexen Lipidgemisches erheblich erleichtert (Sun *et al.*, 2008), da Überlagerungen unterschiedlicher Addukte und Unterschieden in der Fettsäurezusammensetzung nur noch eine untergeordnete Rolle spielen. Dies kann sicher nicht mit dem pK -Wert der 9-AA Matrix erklärt werden (seine Protonierungskraft ist geringer als die von DHB), sondern muss auf eine hohe Natriumionenaffinität des 9-AA zurückzuführen sein. Diese Details sind aber bislang nur ungenügend untersucht und es gibt generell nur wenige Arbeiten zum Gasphasenverhalten der verschiedenen MALDI-Matrices.

Obwohl "Lipidomics" mittels MALDI-TOF MS zunehmend Anwendung findet, gibt es immer noch einige methodische Probleme und daher Optimierungsbedarf. Diese

Arbeiten müssen unbedingt auf das relevante System zugeschnitten werden. Ein weiteres Problem ist die quantitative Auswertung der Spektren. Hier wird allgemein davon ausgegangen, dass für jede relevante Lipidklasse ein entsprechender interner Standard der Probe zugesetzt werden muss. Dies hat jedoch zwei wesentliche Nachteile: Zum einen ist dieser Ansatz teuer, da in der Regel deuterierte Lipide als Standards Anwendung finden. Zweitens muss der Standard in einer Konzentration vorliegen, die ungefähr den Konzentrationen der relevanten Lipide entspricht. Somit sind Vorkenntnisse über die zu erwartenden Lipidkonzentrationen unumgänglich. Um diese Nachteile zu vermeiden, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwieweit relative Intensitätsverhältnisse (insbesondere von PC und LPC) zur Charakterisierung einer biologischen Probe bereits ausreichend sind. Dieses Verfahren ist allerdings noch nicht umfassend etabliert. Deshalb war der Fokus des ersten Teils der vorliegenden Arbeit die Optimierung der Methode auf ausgewählte Standardlipide. Weiterhin erfolgten Optimierungen im Hinblick auf die verwendeten Matrices und die Anwendung der Bligh & Dyer Extraktion zur Anreicherung der Lipide aus Spermien unterschiedlicher Spezies.

Optimierung mittels Standardlipiden

Für die Optimierung der MALDI-TOF MS Methodik zur Bestimmung des PC/LPC-Verhältnisses in Spermienextrakten wurden zunächst Gemische kommerziell verfügbarer Standardlipide verwendet. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass sich ein Gemisch von Standardlipiden ähnlich verhalten wird, wie ein aus einer biologischen Probe extrahiertes Lipidgemisch. Da das Augenmerk der Arbeit (in Anlehnung an das bearbeitete DFG-Projekt) vor allem die Phosphatidylcholine (PC) und Lysophosphatidylcholine (LPC) betrifft, wurden als Standard das gesättigte LPC 19:0 (das in zellulären Proben nicht zu erwarten ist und damit potentiell als interner Standard Anwendung finden könnte) und ein in vielen zellulären Membranen reichlich vorkommendes, einfach ungesättigtes PC, nämlich PC 16:0/18:1 (POPC) verwendet. PC und LPC sind mittels MALDI-TOF MS sehr gut und bereits ohne chromatographische Trennung der komplexen Lipidgemische detektierbar (Bresler *et al.*, 2011), da sie über die gleiche Kopfgruppe verfügen, die die Ionenausbeute maßgeblich bestimmt. Für die Messungen werden aufgrund ihrer schon erwähnten Vorteile DHB und 9-AA als MALDI-Matrices verwendet.

In initialen Experimenten wurde eine feste, absolute Lipidmenge eingesetzt, die Verhältnisse zwischen PC und LPC aber in weiten Grenzen variiert. Es konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Fragmentierung der eingesetzten Lipide kommt. Dies betrifft sowohl den möglichen Verlust der Kopfgruppe wie auch den Verlust der beiden Fettsäurereste. Um bestmögliche Spektren zu erhalten, ist es jedoch sehr wichtig, dass die Matrix immer im großen Überschuss (mindestens hundertfach) zum Analyten eingesetzt wird. Auch sollte die Konzentration der Lipide eine gewisse Konzentration (etwa 200 µg/ml) in der Ausgangslösung nicht überschreiten (Bresler *et al.*, 2011), da es sonst zu einer Sättigung des Detektors kommt und die Spektren nicht mehr quantitativ ausgewertet werden können. Wenn die Probe andererseits sehr dünn ist, wird das erzielbare Signal-Rausch-Verhältnis immer schlechter und der Fehler bei der Auswertung der Spektren immer größer. Diese Details wurden bereits von Nimptsch *et al.*, 2009 untersucht, allerdings nicht anhand von Lipiden sondern von komplexen, sulfatierten Kohlenhydraten. Betrachtet man sich die Peakintensitäten von LPC und PC, so fällt auf, dass LPC sensitiver detektiert wird als PC und man eine geringere Konzentration an LPC benötigt, um Peaks mit gleicher Intensität zu erhalten. Grund dafür ist die unterschiedliche Ionenausbeute, die in erster Linie vom Molekulargewicht, aber auch von den Geräteparametern abhängig ist - nicht zuletzt von dem "Delay", der im "Delayed Extraction" Modus entscheidend ist. "Schwerere" Lipide (wie PC) lassen sich weniger effizient ionisieren und können dadurch nur mit einer geringeren Empfindlichkeit im Vergleich zu etwa LPC detektiert werden (Bresler *et al.*, 2011). Deshalb wurde für alle folgenden Experimente ein PC/LPC-Verhältnis von 80:20 (w/w) bei einer absoluten Lipidkonzentration von 200 µg/ml verwendet. Dies ist auch aus physiologischen Gründen angebracht, da bei biologischen Proben immer mehr PC als LPC zu erwarten ist.

Optimierung der Laserintensität und Reflektorspannung

Dass die Laserintensität einen großen Einfluss auf die Spektrenqualität hat, ist bereits in früheren Arbeiten gezeigt worden (Benard *et al.*, 1999). Wie groß der Einfluss jedoch tatsächlich ist und ob dieser Effekt signifikant auch die Bestimmung des PC/LPC-Verhältnisses beeinflusst, sollte exemplarisch untersucht werden. Dafür wurde das eingangs erwähnte PC/LPC Gemisch (80:20) (w/w) mit einer absoluten, gesamten Lipidkonzentration von 200 µg/ml verwendet und alle anderen experimentellen Bedingungen konstant gehalten. Lediglich die Laserintensität wurde

variiert. Die Auswertung der Spektren ergab, dass es mit steigender Laserintensität zur Bildung von Fragment-Ionen kommt. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Arbeiten von Al-Saad *et al.* (2003) und Pridmore *et al.* (2011). Die Fragment-Ionen können durch die Abspaltung der Cholin-Kopfgruppe bzw. die Spaltung an der Doppelbindung unter Bildung von Aldehyden bzw. Carbonsäuren erklärt werden. Obwohl eine detaillierte Analyse der letztgenannten Produkte nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, kann man davon ausgehen, dass diese Produkte mit einem geringen Anteil oxidierter Lipide in den eingesetzten Lipiden zu erklären sind.

Zusätzlich verändert sich mit zunehmender Laserintensität das PC/LPC-Verhältnis, wobei der relative Anteil von LPC zunimmt. Deswegen ist es insbesondere für quantitative Untersuchungen wichtig die Laserintensität so gering wie möglich zu halten, um keine Verfälschungen durch Fragment-Ionen zu erhalten.

Neben der Laserintensität wurde auch der Einfluss der Reflektorspannung untersucht. Die methodischen Details dazu sind im Buch von Hillenkamp und Peter-Katalinic (2007) erläutert und sollen hier nicht erschöpfend erklärt werden: Zusammengefasst führt eine Erhöhung der Reflektorspannung zu einer höheren Empfindlichkeit; allerdings auch zu einem erhöhten Rauschlevel. In dem entsprechenden Experiment wurden alle Bedingungen und Geräteeinstellungen konstant gehalten und nur die Reflektorspannung variiert. In Abb. 10 ist deutlich zu erkennen, dass sogar eine sehr hohe Reflektorspannung (die zur Messung stark verdünnter Proben erforderlich ist) keine signifikanten Veränderungen der Peakintensitäten zur Folge hat. Bei Erhöhung der Reflektorspannung entstehen weder Fragment-Ionen noch verändert sich das PC/LPC-Verhältnis. Dies zeigt, dass man insbesondere für quantitative Untersuchungen die Laserintensität möglichst gering und die Reflektorspannung so hoch als nötig halten sollte.

Optimierung der verwendeten Matrices

Neben den oben erwähnten instrumentellen Parametern haben die eingesetzten Matrices (sowie der Details ihrer Applikation) einen noch gravierenderen Einfluss auf die Qualität der MALDI-Spektren. Dies wurde bereits in früheren Arbeiten untersucht (Sun *et al.*, 2008), wo u. a. auch die extreme Abhängigkeit der in Gegenwart von 9-AA aufgenommenen Spektren von den eingesetzten Lösungsmitteln bzw. Gemischen dokumentiert wurde. Zwar sind die molekularen Mechanismen noch weitgehend unbekannt (Fuchs *et al.*, 2009), allerdings dürfte die Homogenität der

Matrix/Analyt-Cokristallisation eine entscheidende Rolle spielen. Ziel der nächsten Experimente war es deshalb die Lösungsmittelabhängigkeit der Spektrenqualität eingehender zu untersuchen und insbesondere die Parameter für eine optimale Reproduzierbarkeit der einzelnen Messungen zu ermitteln. Dabei wurden die besten Ergebnisse für beide Matrices (DHB und 9-AA) bei Anwendung eines Gemisches von Isopropanol/Acetonitril (60:40 (v:v)) erzielt. Dieses Lösungsmittelgemisch wurde deshalb für alle folgenden Experimente übernommen.

Optimierung der MALDI-MS für biologische Proben

Die bisherigen Optimierungsschritte wurden mit isolierten Standardlipiden durchgeführt. Somit ist ungeklärt, ob die Resultate an dem Modellsystem auf komplexere biologische Gemische übertragen werden können, wobei sich insbesondere ein hoher Protein- wie auch Salzgehalt störend auswirken könnte. Um dies eingehender zu untersuchen wurde zu humanen Seminalplasma ein definiertes PC/LPC Gemisch (80:20 (w/w) mit einer absoluten totalen Lipidkonzentration von 200 µg/ml) gegeben. Anschließend wurde extrahiert und die Lipidextrakte mittels MALDI-TOF MS charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass das PC/LPC Gemisch mit steigender Konzentration zwar die eigentlichen Lipidsignale des SP unterdrückt, die relativen Peakverhältnisse von PC und LPC jedoch unverändert bleiben. Aufgrund dieser Tatsache wurden für die nachfolgenden Analysen lediglich die relativen Peakverhältnisse von PC und LPC verwendet und auf die Anwendung interner Standards verzichtet.

5.2 Optimierung der Lipidextraktion verschiedener biologischer Proben

Allen durchgeführten Extraktionen in dieser Arbeit liegt das Bligh & Dyer Verfahren zu Grunde (Bligh and Dyer, 1959). Bei diesem Extraktionsverfahren werden komplexe, wässrige Proben mit Methanol und Chloroform versetzt, um so die apolaren Bestandteile (insbesondere Lipide) in der Chloroformphase anzureichern. Bei dieser Extraktion müssen jedoch, je nach vorliegendem System (Protein- und Salzgehalt), einige Schritte optimiert werden. Dazu zählen die Verhältnisse der zugegebenen Lösungsmittel (im Vergleich zum Volumen der wässrigen Phase) sowie die Dauer des Mischens und der Zentrifugation, um die Einstellung des Phasengleichgewichts zu beschleunigen.

Zunächst wurde die Extraktion isolierter humaner Spermien optimiert. Um eine Aussage über die Lipidausbeute bei der Extraktion machen zu können wurden zwei Standardlipide (LPC 24:0 und PC 14:0/16:0, die beide in Spermien nicht vorkommen) den humanen Spermien in einer definierten Menge zugesetzt und mitextrahiert. Es zeigte sich, dass es für die maximale Ausbeute reicht, die Probe 1 Minute intensiv zu mischen und 10 Minuten bei niedrigen Umdrehungszahlen zu zentrifugieren. Trotzdem sei darauf hingewiesen, dass es durch die Extraktion zu einem erheblichen Lipidverlust kommt. Ein Teil der Lipide geht bereits dadurch verloren, dass die untere, organische Phase nicht quantitativ gewonnen werden kann, um eine Kontamination durch die obere, wässrige Phase zu vermeiden (siehe Abb. 13). Damit kommt es zwar zu einer Reduktion der absoluten Lipidausbeute, die relative Zusammensetzung bleibt aber konstant. Wesentlich gravierender fällt deshalb der Verlust von Lipiden ins Gewicht, die entweder in der wässrigen Phase verbleiben oder an Proteine in der Interphase gebunden werden, da dies zu einer Änderung der relativen Zusammensetzung des Lipidextraktes führt. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Verluste an zwitterionischen Lipiden (insbesondere von PC) nur marginal sind, während es zu massiven Verlusten von sauren Lipiden wie z.B. PI oder PS kommt (Nouri-Sorkhabi *et al.*, 1996).

Zu den biologischen Proben, die in dieser Arbeit untersucht wurden zählen nicht nur isolierte Spermien, sondern auch Seminal- und Blutplasma. Im Gegensatz zu den Spermien enthalten das SP und das Blutplasma einen viel höheren Proteinanteil, was die eindeutige Trennung der organischen und der wässrigen Phase erschwert. Beispielsweise liegt der Proteingehalt beim SP etwa bei 60-80 g/l (Mann *et al.*, 1981); also viel höher als der Lipidanteil der Spermien. Je höher der Proteinanteil in der biologischen Probe ist, desto "voluminöser" ist das an der Phasengrenze ausgefallene Protein. Da die denaturierte Proteinschicht beim SP und Blutplasma sehr stark ausgeprägt ist, wurde ein größeres Volumen an Chloroform (im Vergleich zu den Spermien) nötig, um die organische Phase noch gut isolieren zu können. Die entsprechend optimierten Bedingungen wurden für alle folgenden Versuche mit Spermien und SP angewandt.

5.3 Optimierte Lagerungen von Spermien und SP

Aufgrund der zunehmenden männlichen Infertilität (Popkin *et al.*, 1994) gewinnen die medizinischen/diagnostischen Untersuchungen an Spermien bzw. Seminalplasma immer mehr an Bedeutung. Die Etablierung von schnellen, einfachen und preiswerten Techniken, bei denen die Spermienqualität standardisiert gemessen werden kann, ist deshalb von extremer Relevanz. Die Bestimmung der Lipidzusammensetzung (bzw. die Messung des Anteils bestimmter "Markerlipide") scheint hier besonders aussichtsreich, da in den organischen Extrakten kaum mehr Stoffwechselprozesse ablaufen, die die Ergebnisse der Messungen u.U. verfälschen würden. Somit ist es möglich eine ganze Reihe an Proben zu gewinnen und zu einem geeigneten Zeitpunkt gesammelt zu vermessen.

Lagerbedingungen von humanen Spermien

Zunächst wurde das Lagerungsverhalten von humanen isolierten Spermien sowie des entsprechenden SP sowohl bei Raumtemperatur wie auch bei -20°C untersucht. Die Lagerung bei RT kann als Positivkontrolle gesehen werden, da hier Veränderungen eintreten werden. Erst nach der Lagerung über bestimmte Zeiten wurden die isolierten Spermien extrahiert und die eingetretenen Veränderungen der Lipidzusammensetzung mittels MALDI-TOF MS untersucht. Parallel dazu wurden auch organische Extrakte von Spermien und SP bei RT und bei -20°C gelagert, wobei allerdings kaum Änderungen nachgewiesen werden konnten, was wahrscheinlich u.a. am geringeren Lipidgehalt liegt. Etwaige Änderungen sind also zum ganz überwiegenden Teil auf metabolische Prozesse zurückzuführen, die ohne Extraktion der Proben (also in der wässrigen Phase) mit Sicherheit ablaufen. Erfolgt eine Lagerung humaner Spermien bei RT, bleibt die Lipidzusammensetzung überraschenderweise nahezu konstant. Allerdings steigt der Gehalt an LPC 16:0 langsam an. Da LPC ein etabliertes Oxidationsprodukt des Phosphatidylcholins ist, war die Entstehung von LPC auch zu erwarten. LPC kann über drei verschiedene Mechanismen aus PC gebildet werden: enzymatisch in Gegenwart des Enzyms Phospholipase A₂ (Petković *et al.*, 2002) oder durch ROS (Engl: "reactive oxygen species") (Arnhold *et al.*, 2002), wobei der ungesättigte Fettsäurerest in *sn*-2 Position abgespalten wird. Eine dritte Möglichkeit ist eine verminderte Reacylierung des LPC zu PC. Diese verschiedenen Möglichkeiten sind in Abb. 22 zusammengefasst.

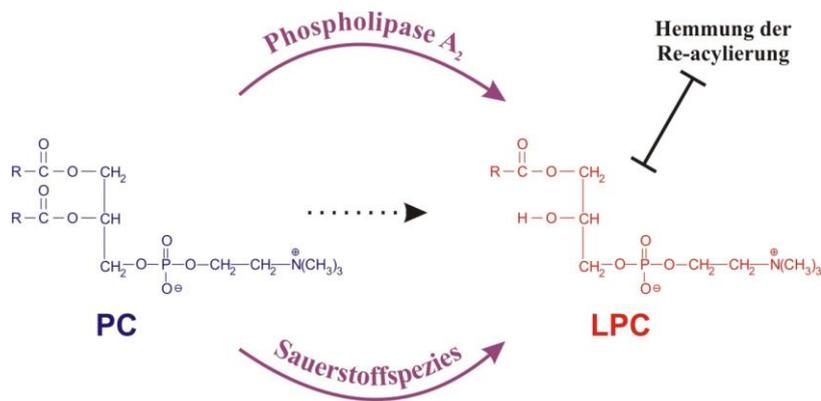


Abb 22 : Enzymatische und nichtenzymatische Generierung bzw. Anreicherung von LPC über ausgewählte Mechanismen.

Unabhängig von den molekularen Ursachen erfolgt somit eine Reduktion des PC/LPC-Verhältnisses bei längerer Lagerung. Dies wurde parallel mit einem Vitalitätstest unter Verwendung von Eosin und einem Motilitätstest bestätigt (WHO, 2010), so dass die MS-Resultate mit etablierten Verfahren zur Bestimmung der Spermengüte eindeutig korrelieren. Dass die Spermienqualität (bzw. der Anteil apoptotischer Spermien) direkt mit dem PC/LPC-Verhältnis korreliert, wurde bereits in einer früheren Arbeit von Glander *et al.*, (2002) gezeigt und konnte durch die hier durchgeführten Analysen bestätigt werden.

Zusätzlich wurde die Lagerung der Spermien bei -20°C untersucht. Hier erfolgt die Veränderung der Lipidzusammensetzung erwartungsgemäß sehr viel langsamer: Erst nach 14 Tagen konnte unter diesen Bedingungen eine geringe Menge an LPC 16:0 detektiert werden. Die unter diesen Bedingungen nachgewiesenen Veränderungen sind kaum stärker als bei der Lagerung eines Lipidextraktes in Substanz bzw. in organischen Lösungsmitteln.

Zuletzt wurde die zeitabhängige Lagerung von Seminalplasma bei -20°C durchgeführt. Im Gegensatz zu den Spermien ist beim SP schon nach wenigen Tagen ein signifikanter Anstieg von LPC 16:0 evident. Dies deutet auf eine erhöhte PLA₂-Aktivität im SP.

Es konnte somit in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass alle Proben vor der Lagerung extrahiert werden sollten, um eine Veränderung der Lipidzusammensetzung (und insbesondere eine Reduktion des PC/LPC-Verhältnisses) zu vermeiden.

5.4 Vergleich der Lipidzusammensetzung humaner Spermien gesunder und fettleibiger Spender

In den letzten Jahren gab es eine zunehmende Anzahl von Studien, die einen Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit bzw. Adipositas (Übergewicht entspricht einem BMI zwischen 25 und 30 / Adipositas beginnt mit einem BMI $\geq 30,0$ (Hauner *et al.*, 2007) und verringerter männlicher Fertilität zeigten (Pasquali *et al.*, 2007; Kort *et al.*, 2006). "Fertilität" ist dabei abhängig von der Spermien-Konzentration (Paasch *et al.*, 2010) sowie von der Anzahl der motilen Spermien (Hammoud *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte auch eine Veränderung der Spermienmorphologie (eine signifikante Reduktion normal motiler Spermien bei fettleibigen Probanden) und eine erhöhte DNA-Fragmentierung bei adipösen Patienten festgestellt werden (Kort *et al.*, 2006).

Die Adipositas ist ein Zustand, der systemischen oxidativen Stress auslöst (Ozata *et al.*, 2002; Furukawa *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2007). Beim oxidativen Stress werden verstärkt ROS (reaktive Sauerstoffspezies) gebildet. Allerdings bleibt die stationäre Konzentration der meisten ROS nahe Null, da die ROS aufgrund ihrer hohen Reaktivität sofort mit anderen Verbindungen (oft diffusionskontrolliert) reagieren. Dies führt zu Oxidationen von Proteinen aber auch von Lipiden (Lipidperoxidation), wobei Reaktionen zwischen den ROS und den Thiol- und Aminoresten von Proteinen sehr viel schneller ablaufen als mit den Doppelbindungen von Lipiden (Pattison *et al.*, 2003). Daher können ROS, wenn sie über das normale Maß hinaus gebildet werden, extrem toxisch auf menschliche Spermien wirken (Jones *et al.*, 1979) und somit auch eine signifikante Rolle bei der Entstehung männlicher Infertilität spielen (Kasturi *et al.*, 2008), indem sie z.B. zur Erhöhung des LPC-Anteils in den Spermien führen. Deshalb ist eine zentrale Hypothese dieser Arbeit, dass ein reduziertes PC/LPC-Verhältnis Aussagen über die Qualität von Spermien ermöglicht. Obwohl eine Verhältnisbildung (wie sie in der vorliegenden Arbeit fast ausschließlich verwendet wird) keine sicheren Aussagen über die Konzentrationen der einzelnen Lipidspezies zulässt, hat dieser Ansatz den entscheidenden Vorteil, dass kein Zusatz eines internen Standards nötig ist und es deshalb auch zu keiner Veränderung der Probe kommt. Bei LPC handelt es sich um eine definierte Verbindung. Dies macht die Bestimmung dieses Oxidationsproduktes wesentlich einfacher als die Vielzahl der Produkte, die bei der Oxidation von Proteinen entstehen würden und deren genaue Bestimmung eine komplexe Auftrennung der Probe erfordern würde.

Die humanen Spermien wurden vom SP abgetrennt und die Zellen wie auch das Plasma separat extrahiert und mittels MALDI-TOF MS charakterisiert. Als Kontrollen dienten normalgewichtige Probanden. In Abb. 18 wurden die Spektren der Spermien und des SP eines normalgewichtigen Probanden gezeigt. Es konnten im Massenspektrum insbesondere verschiedene PC-Spezies detektiert werden, wobei die intensivsten Peaks PC 16:0/22:6, PC 16:0/18:2, PC 18:0/18:3, PC 18:0/18:2, PC 18:0/22:6 und PC 16:0/18:1 entsprechen. Diese typische Zusammensetzung konnte auch schon in früheren Studien wie Leßig *et al.* (2005) nachgewiesen werden. Die fast ausschließliche Detektierbarkeit von PC im Lipidgemisch ist nicht überraschend, da PC aufgrund der permanenten positiven Ladung seiner Cholin-Kopfgruppe hervorragend detektierbar ist und es deshalb zur Unterdrückung anderer, weniger gut (im positiven Ionenmodus) nachweisbarer Lipide kommt ("Ionensuppression"). Auch wurden kleinere Mengen an SM 16:0 und LPC 16:0 detektiert. Vergleicht man die im positiven Ionenmodus aufgenommenen Spektren des Spermienextraktes mit dem SP-Extrakt, sieht man im SP-Extrakt kaum PC-Spezies (Schiller *et al.*, 2000), aber eine relativ hohe Menge an LPC 16:0, welches wahrscheinlich durch Einwirken von PLA₂ oder durch ROS aus den PCs (Fuchs *et al.*, 2012) gebildet worden ist. Eine geringe LPC-Konzentration ist in allen Ejakulaten (auch von gesunden Spendern) vorhanden und stammt zum einem von Leukozyten (De Lamirande *et al.*, 1995), die einem besonders hohen oxidativen Stress unterliegen, und zum anderen von den Spermien selbst (Aitken *et al.*, 1992; 1997). In geringen Konzentrationen wirkt LPC als physiologischer Transmitter bzw. als Lipid Second Messenger. Auch wird davon ausgegangen, dass eine moderate Menge an LPC essentiell für die Kapazitation und die Akrosomenreaktion ist (De Lamirande *et al.*, 2008). Bereits vor über 30 Jahren konnte aber gezeigt werden, dass Lyso-Lipide zur Destabilisierung der Zellmembran führen und sie deshalb vom Organismus schnell wieder zu PCs recycelt werden müssen, um eine Akkumulation zu vermeiden (Pratt *et al.*, 1978). Des Weiteren konnten 1981 Fleming und Yanagimachi zeigen, dass exogenes LPL die Akrosomenreaktion in Meerschweinchenspermien auslösen kann. LPC stellt auch ein bioaktives, proinflammatorisches Lipid dar, das vor allem unter pathologischen Bedingungen (erhöhte Aktivitäten von Phospholipasen, verstärkte Generierung von ROS) erzeugt wird (Matsumoto *et al.*, 2007). Somit stellt LPC einen sehr wichtigen Lipidmediator bei Entzündungen dar (Lands *et al.*, 1968; Jackson *et al.*, 2008). LPC besitzt eine starke Wirkung auf

kultivierte Zellen. So konnte gezeigt werden, dass LPC einen Einfluss auf immunregulatorische Zellen (wie die z.B. Makrophagen) hat und somit Entzündungen und Immunantworten beeinflusst. LPC scheint somit eine signifikante Rolle bei entzündlichen Erkrankungen wie Arteriosklerose und/oder Autoimmunerkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis zu spielen (Matsumoto *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2005). Für die Auswertung der MALDI Massenspektren war es ein großer Vorteil, dass fast nur die H⁺ Addukte (aber nicht die Na⁺ Addukte) der verschiedenen Lipide detektiert wurden. Dies ist ein wesentlicher Vorteil, der sich bei 9-AA als Matrixsubstanz ergibt: Dies führt zu einer wesentlich einfacheren Peakzuordnung bereits in den MS¹-Spektren und erhöht außerdem die Nachweisempfindlichkeit. Ein weiterer Vorteil bei der Anwendung dieser Matrix ist, dass man mit 9-AA auch Spektren sehr gut im negativen Ionenmodus aufnehmen kann und 9-AA (im Gegensatz zu DHB) hier nur einen sehr geringen Matrixhintergrund liefert.

Da nicht alle (Phospho)-Lipide gleich gut im Positiv- und im Negativionenmodus detektiert werden können, ist es bei biologischen Proben von Bedeutung auch Spektren im Negativionenmodus aufzunehmen, um einen möglichst vollständigen Überblick über die Zusammensetzung zu erhalten (Fuchs *et al.*, 2009). Eigentlich ist es bei den meisten biologischen Proben kein größeres Problem saure Lipidspezies (wie PI oder PS) zu detektieren. Allerdings wird die Detektion dieser Phospholipide im Falle der Spermien, aufgrund der hohen Konzentration von Seminolipid (1-O-palmitoyl-2-O-palmitoyl-3-β-(3'-sulfolactosyl)-glycerol), unterdrückt (Teuber *et al.*, 2011). Das Seminolipid ist ein starker Elektrolyt aufgrund seiner Sulfatgruppe und liegt grundsätzlich deprotoniert, also als Anion vor. Es unterdrückt deshalb die Detektion aller anderen, weniger stark sauren (Phospho)-Lipide. Deshalb konnten im Spermienextrakt nur geringe Mengen an PE (insbesondere GPE 16:0_{alkyl}/22:6_{acyl}) nachgewiesen werden. Im SP-Extrakt ist zwar nur eine geringere Menge an Seminolipid vorhanden, was aber auch für die anderen sauren Lipide gilt, so dass sie nicht (oder doch nur mit sehr geringen Intensitäten) detektiert werden können.

Vergleicht man nun das Spermien- und das SP-Extrakt des adipösen Spenders miteinander, so fällt auf, dass ihre Lipidzusammensetzungen sehr ähnlich sind. Es wurden die gleichen PCs, SMs und LPCs, wie auch vergleichbare Anteile dieser Lipide detektiert. Im SP ist jedoch die LPC-Konzentration etwas höher und somit das PC/LPC-Verhältnis niedriger. Vergleicht man die Spermienextrakte des normalgewichtigen Spenders mit dem adipösen Probanden, sind zwei signifikante

Unterschiede festzustellen: Bei den Spendern mit hohem BMI wurde ein erhöhter Gehalt an SM detektiert. Neben SM 16:0 wurden zusätzlich auch SM 18:0, SM 20:0, SM 22:0 und SM 24:0 nachgewiesen. Diese charakteristische Veränderung des SM-Gehaltes in Abhängigkeit des BMI konnte auch schon in den Lipidextrakten der Erythrozyten fettleibiger Frauen beobachtet werden (Younsi *et al.*, 2002). Warum so viele verschiedene Sphingomyeline bei den adipösen Spendern zu detektieren waren, konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Diese Messungen haben somit eindeutig gezeigt, dass der SM-Gehalt wie auch das PC/LPC-Verhältnis der Lipidextrakte isolierter humaner Spermien nützliche Marker für die Spermienqualität darstellen. Es ist somit möglich die Spermien von gesunden und von adipösen Spender zu unterscheiden.

5.5 Vergleich muriner epididymaler Spermien aus Cauda und Caput

Bei den Untersuchungen humaner Spermien war aufgefallen, dass es gravierende individuelle Unterschiede bei den einzelnen Lipid-Verhältnissen gab. Es stellte sich die Frage, ob es wirklich reine individuelle Schwankungen sind oder möglicherweise die beobachteten Unterschiede auf unterschiedliche Anteile reifer und unreifer Spermien zurückzuführen sind, da die Probanden vielleicht die 3 Tage sexueller „Enthaltsamkeit“ vor der Samenspende nicht eingehalten haben. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass die Spermien in der Epididymis verschiedene Reifungsprozesse durchlaufen, bei denen sich die Morphologie und die Zusammensetzung der Membran beträchtlich verändert (Cooper *et al.*, 1998; Kirchhoff *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Daher sollte im letzten Teil der Arbeit untersucht werden, ob und wie die Umbauprozesse während der Reifung der Spermien auch die Lipidzusammensetzung betreffen. Aus praktischen wie auch ethischen Gründen (Bellve *et al.*, 1977; Rusell *et al.*, 1990) wurde dafür die murine Epididymis herangezogen und die Lipidzusammensetzung der Spermien aus Cauda und Caput mittels MALDI-TOF MS untersucht.

Es ist auffällig, dass die murinen Spermien einen relativ hohen Anteil an Stearinsäureresten (18:0) in der *sn*-1 Position der PCs aufweisen. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu humanen Spermien, wo ganz überwiegende Palmitinsäure (16:0) in der *sn*-1 Position des PC gebunden ist (Leßig *et al.*, 2004). Außerdem wurde auch ein signifikanter Umbau der Fettsäurereste der Lipide von murinen epididymalen Spermien während der Bewegung durch die Epididymis beschrieben

(Rejraji *et al.*, 2006). Mittels MALDI-MS konnte gezeigt werden, dass in der Membran aus dem Caput mehr PC und PE aber weniger SM, im Vergleich zu den Spermien aus dem Cauda, enthalten sind.

Vergleicht man die Spermienlipide von Caput und Cauda, so waren in den Spermien vom Caput deutlich mehr höher ungesättigte Fettsäurereste nachweisbar als in den Spermien vom Cauda. Diese Daten belegen, dass die Spermienmembran während der epididymalen Reifung (von Caput zu Cauda) aufgrund des erhöhten Gehalts an Doppelbindungen fluidierter wird. Diese charakteristische Veränderung der Lipidzusammensetzung, besonders im Hinblick auf die ungesättigten Fettsäurereste in den *sn*-2 Positionen der PLs, korreliert auch mit einer veränderten Spermienmotilität. Die Kettenlänge der Fettsäurereste und die Anzahl der Doppelbindungen sind erwiesenermaßen entscheidend für die Fluidität der Membran, die Motilität (Zalata *et al.*, 1998) und die Fertilität der Spermien (Müller *et al.*, 1999). Interessanterweise gibt es nicht nur Unterschiede im Sättigungsgrad, sondern auch im LPC-Gehalt. In den Spermienmembranen aus dem Cauda sind sowohl die LPC-Menge wie auch der Gehalt an Doppelbindungen in den Phospholipiden signifikant höher. Einen Anstieg des Plasmalogengehalts von Caput zu Cauda wurde bereits an Rattenspermien nachgewiesen (Avelano *et al.*, 1992). Zusätzlich konnte hier auch Formyl-LPC detektiert werden. Formyl-LPC wird ausschließlich durch die Oxidation von Plasmalogenen an der ausgezeichneten Ether-Doppelbindung erzeugt (Fuchs *et al.*, 2007). Dies ist ein entscheidender Unterschied zu LPC: Eine erhöhte Konzentration von LPC kann sowohl durch die Aktivität von Phospholipasen (Roldan *et al.*, 2007) wie auch durch Reaktionen der Plasmalogene mit ROS erklärt werden. Die hohe biologische Relevanz der Plasmalogene wird insbesondere durch ihre antioxidativen Eigenschaften begründet: Die Alkenyl-Ether-Gruppen der Plasmalogene zeigen eine höhere Reaktivität mit ROS als Fettsäureester mit vergleichbaren Sättigungsgraden (Nagan *et al.*, 2001). Neben PC wurde primär Sphingomyelin detektiert. SM ist essentiell für die Funktion der Spermien und beeinflusst das Ausmaß der Kapazitation (Visconti *et al.*, 1999). Ein erhöhtes Verhältnis zwischen SM und PC verhindert zudem die frühzeitige Kapazitation während der Lagerung im Cauda. Die Cauda ist die wichtigste Lagerstelle für reife Spermien (Gloria *et al.*, 2011) und entscheidend für die zunehmende Spermienkonzentration vor einer Ejakulation. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnte somit bestätigt werden, dass es während der Spermienreifung in der

Epididymis zu Umbauprozessen in den Membranen kommt, die von einer Veränderung der Lipidzusammensetzung begleitet werden.

Desweiteren wird in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass sich die murinen Ergebnisse auch auf die humanen Spermien übertragen lassen. Aufgrund der unterschiedlichen Reifestadien der murinen Spermien und der damit in Zusammenhang stehenden abweichenden Membranlipid-Zusammensetzung kann damit eine mögliche Begründung gegeben sein, warum das humane Ejakulat so große individuelle Unterschiede hinsichtlich der Lipidzusammensetzung aufweist.

6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde die Lipidzusammensetzung von Spermien im Allgemeinen und insbesondere von humanen Spermien als außerordentlich wichtig erkannt. Dies gilt nicht zuletzt aufgrund der drastischen Zunahme von Fettleibigkeit und Adipositas und der damit im Zusammenhang stehenden männlichen Infertilität. Es etablierten sich gleichzeitig immer bessere (insbesondere massenspektrometrische) Methoden für die Lipidanalytik, was die Untersuchungen der Spermienlipid-Zusammensetzung somit erheblich erleichterte.

In der vorliegenden Arbeit stand die Lipidanalyse von Spermien mittels MALDI-TOF MS im Mittelpunkt. Dieses moderne analytische Verfahren hat den entscheidenden Vorteil, dass es sehr einfach durchführbar ist, einen großen Probendurchsatz ermöglicht und von der Zusammensetzung der Probe (insbesondere Ionengehalt) nur wenig beeinflusst wird. Um die optimalen Bedingungen sowohl im Hinblick auf die Geräteparameter wie auch die Aufarbeitung der Proben zu etablieren, wurden zunächst Optimierungen hinsichtlich Geräte-Einstellungen, Matrix und Extraktion mit Standardlipiden und anschließend mit biologischen Proben durchgeführt. Die Optimierungen mittels Standardlipiden ergab nach der Extraktion sehr hohe Lipidausbeuten und gleichzeitig sehr geringe Standardabweichungen.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte mit den optimierten Bedingungen ein Vergleich der Lipidzusammensetzungen humaner Spermien und der entsprechenden Seminalplasmen von normalgewichtigen und fettleibigen bzw. adipösen Probanden durchgeführt werden. Die Fettleibigkeit stand im Mittelpunkt, da diese Problematik in den letzten Jahren weltweit (keineswegs nur in den Industrienationen) stark zugenommen hat und im engen Zusammenhang mit der Infertilität der betroffenen Männer steht. Dies wurde anhand des Lysophosphatidylcholin/Phosphatidylcholin (PC/LPC)-Verhältnisses (als Qualitätsmarker) untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sich adipöse Personen durch ein vermindertes PC/LPC-Verhältnis auszeichnen. Zusätzlich erfolgte der Vergleich von Spermien und Seminalplasma (SP). Es konnte gezeigt werden, dass im SP kaum Phosphatidylcholine oder Seminolipid (ein Spermien-typisches Glykolipid) vorkommen, dagegen aber relativ viel LPC 16:0 enthalten ist. In humanen Spermien gesunder Spender wurden verschiedene PC-Spezies, SM und Seminolipid, aber kein oder nur sehr wenig LPC detektiert. Die Lipidzusammensetzung von

normalgewichtigen und fettleibigen Samenspendern ist sehr ähnlich. Bei den fettleibigen Spendern ist allerdings ein erhöhter Anteil von Sphingomyelin (SM), oft mit untypisch langen Fettsäureresten, enthalten und auch eine größere Menge an LPC 16:0. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben somit gezeigt, dass sowohl das PC/LPC-Verhältnis als auch der SM-Gehalt als Marker für die Spermienqualität verwendet werden können, da beide Messgrößen mit den gleichermaßen ermittelten spermatologischen Befunden korrelieren.

Die Spermien durchlaufen in der Epididymis verschiedene Reifestadien, bei denen es zu gravierenden Veränderungen in den Membranen kommt. Im dritten Teil dieser Arbeit war der Fokus, die Lipidzusammensetzung von Spermien in verschiedenen Reifestadien zu untersuchen, um zu sehen ob die morphologischen Umbauprozesse auch die (Phospho)-Lipide betreffen. Dies wurde aus praktischen Gründen mit Mäusen als Modelorganismus durchgeführt. Da Lipide (im Gegensatz zu bestimmten Proteinen) ubiquitär vorkommende Verbindungen sind, ist eine Vergleichbarkeit zwischen Mäusen und Menschen anhand der Lipidzusammensetzung im Rahmen des Möglichen. Dafür wurden die murinen Spermien aus dem Cauda und dem Caput der Epididymis analysiert. Zunächst konnte festgestellt werden, dass die murinen Spermien einen hohen Anteil an Stearinsäure haben, die humanen Spermien hingegen überwiegend Palmitinsäure in den Lipiden enthalten. In der Spermienmembran des Caputs wurde viel PC, Phosphatidylethanolamin (PE) und SM detektiert. Die Spermien aus dem Cauda besaßen dafür weniger PC und PE, aber mehr SM und wesentlich mehr unterschiedliche LPC-Spezies, wobei diese auch in viel höheren Mengen vorlagen. Aus dem Cauda isolierte Spermien zeigten auch einen wesentlich höheren Plasmalogengehalt und Formyl-LPC-Gehalt, was auf eine erhöhte Oxidation der Plasmalogene schließen lässt. Es konnte somit gezeigt werden, dass die verschiedenen Umbauprozesse auch die Membranlipide betreffen.

Diese Arbeit konnte somit einen Beitrag hinsichtlich der Methodenoptimierung von MALDI-TOF MS leisten. Es ist möglich Lipide der Spermien einfach, bequem und schnell detektieren zu können. In der Arbeit konnten weiterhin Zusammenhänge zwischen Fettleibigkeit und Spermienqualität aufgezeigt und damit frühere Daten bestätigt werden. Nicht zuletzt konnten wichtige Prozesse bei der murinen Spermienreifung in der Epididymis bzw. die damit in Zusammenhang stehenden Änderungen der Lipidzusammensetzung belegt werden.

7 Literatur

- [1] Abou-Haila, A., Tulsiani, D.R. (2009): Transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys* 485: 72-81.
- [2] Agarwal, A., Nallella, K.P., Allamaneni, S.S., Said, T.M. (2004): Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 8: 616-27.
- [3] Aitken, R.J., Buckingham, D.W., West, K.M. (1992): Reactive oxygen species and human spermatozoa analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol* 151: 466-77.
- [4] Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. (1989): Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41: 183-97.
- [5] Aitken, R.J., Fischer, H.M., Fulton, N., Gomez, E., Knox, W., Lewis, B., Irvine, S. (1997): Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev* 47: 468-82.
- [6] Al-Saad, K.A., Zabrouskov, V., Siems, W.F., Knowles, N.R., Hannan, R.M., Hill, H.H. Jr. (2003): Matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry of lipids: ionization and prompt fragmentation pattern. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 87-96.
- [7] Angelini, R., Vitale, R., Patil, V.A., Cocco, T., Ludwig, B., Greenberg, M.L., Corcelli, A. (2012): Lipidomics of intact mitochondria by MALDI-TOF/MS. *J Lipid Res* 53: 1417-25.
- [8] Arnhold, J., Osipov, A.N., Spalteholz, H., Panasenko, O.M., Schiller, J. (2002): Formation of lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines under the influence of hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta* 1572: 91-100.
- [9] Avelzano, M.I., Rotstein, N.P., Vermouth, N.T. (1992): Lipid remodeling during epididymal maturation of rat spermatozoa. *Biochem* 283: 235-41.
- [10] Baccetti, B., Marca, A., Piomboni, P., Capitani, S., Bruni, E., Petraglia, F., De Leo, V. (2002): Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod* 17: 2673-7.
- [11] Bellvé, A.R., Caviccia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M., Dym, M. (1977): Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* 74: 68-85.

- [12] Benard, S., Arnhold, J., Lehnert, M., Schiller, J., and Arnold, K. (1999): Experiments towards quantification of saturated and polyunsaturated diacylglycerols by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Chem. Phys. Lipids* 100: 115-125.
- [13] Blanksby, S.J., Mitchell, T.W. (2010): Advances in mass spectrometry for lipidomics. *Annu Rev Anal Chem* 3: 433-65.
- [14] Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-7.
- [15] Bresler, K., Pyttel, S., Paasch, U., Schiller, J. (2011): Parameters affecting the accuracy of the MALDI-TOF MS determination of the phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine (PC/LPC) ratio as potential marker of spermatozoa quality. *Chem Phys Lipids* 164: 696-702.
- [16] Brugger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F.T., Lehmann, W.D. (1997): Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2339-44.
- [17] Chan, J.M., Rimm, E.B., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (1994): Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diab Care* 17: 961-9.
- [18] Chavarro, J.E., Toth, T.L., Wright, D.L., Meeker, J.D., Hauser, R. (2010): Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 93: 2222-31.
- [19] Cho, Y.T., Su, H., Hunag, T.L., Chen, H.C., Wu, W.J., Wu, P.C., Wu, D.C., Shiea, J. (2013): Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clin Chim Acta* 415: 266-75.
- [20] Coffey, P.J., Geijsen, N., M'rabet, L., Schweizer, R.C., Maikoe, T., Raajmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L. (1998): Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function. *Biochem J* 329: 121-130.
- [21] Cooper, T.G. (1996): Epididymis and sperm function. *Androl* 1: 57-59.
- [22] Cooper, T.G. (1998): Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil* 53(Suppl): 119-136.
- [23] Dannenberger, D., Süß, R., Teuber, K., Fuchs, B., Nuernberg, K., Schiller, J. (2010): The intact muscle lipid composition of bulls: an investigation by MALDI-TOF MS and ³¹P NMR. *Chem Phys Lipids* 163: 157-64.
- [24] De Lamirande, E., Gagnon, C. (1995): Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 10: 15-21.

- [25] De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C. (1997): Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2: 48-54.
- [26] De Lamirande, E., Tsai, C., Harakat, A., Gagnon, C. (1998): Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl* 19: 585-94.
- [27] Dennis, E.A. (2000): Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 32-5.
- [28] Emerson, B., Gidden, J., Lay, J.O. Jr., Durham, B. (2010): A rapid technique for overcoming suppression of triacylglycerols by phosphatidylcholine using MALDI-TOF MS. *J Lipid Res* 51: 2428-34.
- [29] Exton, J.H. (1997): Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation and function. *Physiol Rev* 77: 303-20.
- [30] Fabris, S.M., Valezi, A.C., De Souza, S.A., Faintuch, J., Cecconello, I., Junior, M.P. (2006): Computerized baropodometry in obese patients. *Obes Surg* 16: 1574-8.
- [31] Fernandis, A.Z., Wenk, M.R. (2007): Membrane lipids as signaling molecules. *Curr Opin Lipidol* 18: 121-8.
- [32] Finucane, M.M., Stevens, G.A., Cowan, M.J., Danaei, G., Lin, J.K., Paciorek, C.J., Singh, G.M., Gutierrez, H.R., Lu, Y. (2011): National, regional and global trends in body-mass-index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9,1 million participants. *Lancet* 377: 557-567.
- [33] Fuchs, B., Jakop, U., Göritz, F., Hermes, R., Hildebrandt, T., Schiller, J. (2009): MALDI-TOF „fingerprint“ phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. *Theriogenology* 71: 568-575.
- [34] Fuchs, B., Müller, K., Göritz, F., Blottner, S., Schiller, J. (2007): Characteristic oxidation products of choline plasmalogens are detectable in cattle and roe deer spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry. *Lipids* 42: 991-8.
- [35] Fuchs, B., Müller, K., Paasch, U., Schiller, J. (2012): Lysophospholipids: potential markers of diseases and infertility. *Mini-Rev Med Chem* 12: 74-86.
- [36] Fuchs, B., Schiller, J. (2008): MALDI-TOF MS analysis of lipids from cells, tissues and body fluids. *Subcell Biochem* 49: 541-65.
- [37] Fuchs, B., Schiller, J., Süß, R., Schürenberg, M., 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: 827-34.
- [38] Fuchs, B., Schiller, J., Süß, R., Zscharmack, M., Bader, A., Müller, P., Schürenberg, M., Becker, M., Suckau, D. (2008): Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS. *Anal Bioanal Chem* 392: 849-60.
- [39] Fuchs, B., Schiller, J., Wagner, U., Häntzschel, H., Arnold, K. (2005): The phosphatidylcholine/ lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by ³¹P NMR and MALDI-TOF MS. *Clin Biochem* 38:925-33.
- [40] Fuchs, B., Süß, R., Schiller, J. (2010): An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res* 49: 450-75.
- [41] Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M., Schiller, J. (2011): Lipid analysis by thin-layer chromatography - a review of the current state. *J Chromatogr A* 1218: 2754-74.
- [42] Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. (2004): Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-61.
- [43] Gidden, J., Liyanage, R., Durham, B., 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: 1951-7.
- [44] Glander, H.J., Schiller, J., Süß, R., Paasch, U., Grunewald, S., Arnhold, J. (2002): Deterioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lyso-phosphatidylcholines. *Andrologia* 34: 360-6.
- [45] Gloria, A., Contri, A., De Amicis, I., Robbe, D., Carluccio, A. (2011): Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. *Anim Reprod Sci* 128: 117-122.
- [46] Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Zaima, N., Setou, M. (2009): The specific localization of seminolipid molecular species on mouse testis during testicular maturation revealed by imaging mass spectrometry. *Glycobiology* 19: 950-7.
- [47] Gupta, A., Mahdi, A.A., Ahmad, M.K., Shukla, K.K., Jaiswer, S.P. Shankhwar, S.N. (2011): NMR-spectroscopic studies on human seminal plasma: a probative discriminant function analysis classification model. *J Pharm Biomed Anal* 54: 106-113.
- [48] Hammoud, A.O., Gibson, M., Peterson, C.M., Hamilton, B.D., Carrell, D.T. (2006): Obesity and male reproductive potential. *J Androl* 27: 619-26.

- [49] Hammoud, A.O., Wilde, N., Gibson, M., Parks, A., Carrell, D.T., Meikle, A.W. (2008): Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 90: 2222-2225.
- [50] Hauner, H. (2007): Obesity. *MMW Fortschr Med* 149: 38-41.
- [51] Henry, S.A., Patton-Vogt, J.L. (1998): Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 133-79.
- [52] Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C., Chait, B.T. (1991): Matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 63: 1193-1203.
- [53] Hodgkin, M.N., Pettit, T.R., Martin, A., Michell, R.H., Pemberton, A.J., Wakelam, M.J. (1998): Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messenger? *Trends Biochem Sci* 23: 200-4.
- [54] Holt, W.V., Van Look, K.J. (2004): Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 127: 527-35.
- [55] Iles, K.E., Forman, H.J. (2002): Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res* 26: 95-105.
- [56] Ilio, K.Y., Hess, R.A. (1994): Structure and function of the Ductuli efferentes. A review. *Microsc Res Tech* 29: 432-67.
- [57] Jackson, S.K., Abate, W., Tonks, A.J. (2008): Lysophospholipid acyltransferases: novel potential regulators of the inflammatory response and target for new drug discovery. *Pharmacol Ther* 119: 104-14.
- [58] James, P.T. (2004): Obesity: the worldwide epidemic. *Clin Dermatol* 22: 276-80.
- [59] Jones, R. (1998): Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil* 53 (Suppl): 73-84.
- [60] Jones, R., Mann, T., Sherins, R. (1979): Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31: 531-537.
- [61] Kasturi, S.S., Tannir, J., Brannigan, R.E. (2008): The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 29: 251-59.
- [62] Kaufmann, R. (1995): Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *J Biotechnol* 41: 155-75.
- [63] Kirchhoff, C. (1998): Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 3: 86-95.

- [64] Kishimoto, K., Urade, R., Ogawa, T., Moriyama, T. (2001): Nondestructive quantification of neutral lipids by thin layer chromatography and laser fluorescent scanning: suitable methods for "lipidome" analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 81: 657-62.
- [65] Knochenmuss, R., McCombie, G., Faderl, M. (2006): Ion yield of thin MALDI samples: dependence on matrix and metal substrate and implications for models. *J Phys Chem* 110: 12728-33.
- [66] Kort, H.I., Massey, J.B., Elsner, C.W., Mitchell-Leef, D., Shapiro, D.B., Witt, M.A., Roudebush, W. E. (2006): Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 27: 450-2.
- [67] Lands, W.E., Smuelsson, B. (1968): Phospholipid precursors of prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 164:426-9.
- [68] LeBlanc, M.J., Gavino, V., Perea, A., Yousef, I.M., Levy, E., Tuchweber, B. (1998): The role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin on the secretion of biliary lipids in rats. *Biochim Biophys Acta* 1393: 223-34.
- [69] Leblond, C.P., Clermont, Y. (1952): Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 55: 548-73.
- [70] Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., 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.
- [71] Leßig, J., Fuchs, B. (2009): Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. *Curr Med Chem* 16: 2021-41.
- [72] Leßig, J., Gey, C., Schiller, J., Süß, R., Paasch, U., Grunewald, S., Glander, H.J., Arnhold, J. (2005): Hypochlorous acid- induced stress on human spermatozoa. A model for inflammation in the male genital tract. *Chem Phys Lipids* 135: 201-11.
- [73] Leßig, J., Gey, C., Süß, R., Schiller, J., Glander, H.J., Arnhold, J. (2004): Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B* 137: 265-77.
- [74] Mann, T. (1978): Experimental approach to the study of semen and male reproductive function. *Int J Fertil* 23: 133-7.
- [75] Mann, T., Lutwak-Mann, C. (1981): *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin.

- [76] Matsumoto, T., Kobayashi, T., Kamata, K. (2007): Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis. *Curr Med Chem* 14: 3209-20.
- [77] Mattson, M.P. (2009): Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol* 44: 625-33.
- [78] McDonnell, L.A., Heeren, R.M. (2007): Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 26: 606-43.
- [79] Minassian, E.S., Turner, C. (1966): Biosynthesis of lipids by human and fish spermatozoa. *Am J Physiol* 210: 615-8.
- [80] Monesi, V. (1962): Relation between x-ray sensitivity and stages of the cell cycle in spermatogonia of the mouse. *Radiat Res* 17: 809-838.
- [81] Mortarino, M., Tedeschi, G., Negri, A., Cecilian, F., Gottardi, L., Maffeo, G., Ronchi, S. (1998): Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. *Electrophoresis* 19: 797-801.
- [82] Müller, K., Pomorski, T., Müller, P., Herrmann, A. (1999): Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J Cell Sci* 112: 11-20.
- [83] Munder, P.G., Modolell, M. (1973): Adjuvant induced formation of lysophosphatides and their role in the immune response. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 45: 133-5.
- [84] Murphy, R.C., Gaskell, S.J. (2011): New application of mass spectrometry in lipid analysis. *J Biol Chem* 286: 25427-33.
- [85] Nagan, N., Zoeller, R.A. (2001): Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* 40: 199-229.
- [86] Natarajan, R., Nadler, J.L. (2004): Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1542-8.
- [87] Nguyen, R.H., Wilcox, A.J., Skjaerven, R., Baird, D.D. (2007): Men's body mass index and fertility. *Hum Reprod* 22: 2488-93.
- [88] Nimptsch, A., Schibur, S., Schnabelrauch, M., Fuchs, B., Huster, D., Schiller, J. (2009): Characterization of the quantitative relationship between signal-to-noise (S/N) ratio and sample amount on-target by MALDI-TOF MS: Determination of chondroitin sulfate subsequent to enzymatic digestion. *Anal Chim Acta* 635: 175-82.
- [89] Nouri-Sorkhabi, M.H., Wright, L.C., Sullivan, D.R., Kuchel, P.W. (1996): Quantitative ^{31}P nuclear magnetic resonance analysis of the phospholipids of erythrocyte membranes using detergent. *Lipids*. 31:765-70.

- [90] Ochsendorf, F.R. (1999): Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod* 5: 399-420.
- [91] Olopade, C.O., Zakkar, M., Swedler, W.I., Rubinstein, I. (1997): Exhaled pentane levels in acute asthma. *Chest* 111:862-5.
- [92] Ozata, M., Mergen, M., Oktenli, C., Aydin, A., Sanisoglu, S.Y., Bolu, E., Yilmaz, M.I., Sayal, A., Isimer, A., Ozdemir, I.C. (2002): Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem* 35: 627-31.
- [93] Paasch, U., Grunewald, S., Kratzsch, J., Glander, H.J. (2010): Obesity and age affect male fertility potential. *Fertil Steril* 94: 2898-901.
- [94] Page, J.S., Rubakhin, S.S., Sweedler, J.V. (2002): Single-neuron analysis using CE combined with MALDI MS and radionuclide detection. *Anal Chem* 74: 497-503.
- [95] Parks, J.E., Lynch, D.V. (1992): Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiol* 29: 255-66.
- [96] Pasquali, R., Patton, L., Gambineri, A. (2007): Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14: 482-7.
- [97] Pattison, D.I., Hawkins, C.L., Davies, M.J., (2003): Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins: absolute rate constants, product analysis, and computational modeling. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 439–449.
- [98] Petković, M., Schiller, J., Müller, M., Benard, S., Reichl, S., Arnold, K., Arnhold, J. (2001): Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species. *Anal Biochem* 289: 202-16.
- [99] Petković, M., Müller, J., Müller M., Schiller, J., Arnold, K., Arnhold, J. (2002): Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for monitoring the digestion of phosphatidylcholine by pancreatic phospholipase A2. *Anal Biochem* 308: 61-70.
- [100] Philip, L. Yeagle (1989): Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J* 3: 1833-42.
- [101] Popkin, B.M. (1994): The nutrition transition in low income countries: an emerging crisis. *Nutr Rev* 52: 285-98.
- [102] Pridmore, C.J., Mosely, J.A., Sanderson, J.M. (2011): The reproducibility analysis by MALDI-MS/MS. *Analyst* 136: 2598-605.
- [103] Pulfer, M., Murphy, R.C. (2003): Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev* 22: 332-64.

- [104] Pyttel, S., Zschörnig, K., Nimptsch, A., Paasch, U., Schiller, J. (2012): Enhanced lysophosphatidylcholine and sphingomyelin contents are characteristic of spermatozoa from obese men – A MALDI mass spectrometric study. *Chem Phys Lipids* 165: 861-65.
- [105] Ramlau-Hansen, C.H., Nohr, E.A., Thulstrup, A.M., Bonde, J.P., Storgaard, L., Olsen, J. (2007): Is maternal obesity related to semen quality in the male offspring? A pilot study. *Hum Reprod* 22: 2758-62.
- [106] Ramlau-Hansen, C.H., Thulstrup, A.M., Nohr, E.A., Bonde, J.P., Sorenson, T.I., Olsen, J. (2007): Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod* 22: 1634-1637.
- [107] Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J.M. (2006): Lipid remodelling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod* 74: 1104-1113.
- [108] Roldan, E.R., Shi, Q.X. (2007): Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 12: 89-104.
- [109] Russell, L.B. (1977): Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat* 148: 313-28.
- [110] Russell, L.B. (1990): Pattern of mutational sensitivity to chemicals in poststem-cell stages of mouse spermatogenesis. *Prog Clin Biol Res* 340: 101-13.
- [111] Rüsse, I., Sinowatz, F. (1998): *Gametogenese: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Berlin, Blackwell.
- [112] Saleh, R.A., Agarwal, A., Kandirali, E., Sharma, R.K., Thomas, A.J., Nada, E.A. Evenson, D.P., Alvarez, J.G. (2002): Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 78: 1215-24.
- [113] Sallmen, M., Sandler, D.P., Hoppin, J.A., Blair, A., Baird, D.D. (2006): Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology* 17: 520-523.
- [114] Scheidt, H.A., Huster, D. (2008): The interaction of small molecules with phospholipid membranes studied by ¹H NOESY NMR under magic-angle spinning. *Acta Pharmacol Sin* 29:35-49.
- [115] Schiller, J., Arnhold, J., Benard, S., Müller, M., Reichl, S., Arnold, K. (1999): Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach. *Anal Biochem* 267: 46-56.
- [116] Schiller, J., Arnhold, J., Glander, H.J., Arnold, K. (2000): Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy- effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids* 106: 145-56.

- [117] Schiller, J., Süß, R., Petković, M., Hilbert, N., Müller, M., Zschörnig, O., Arnhold, J., Arnold, K. (2001): CsCl as an auxiliary reagent for the analysis of Phosphatidylcholine mixtures by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Chem Phys Lipids* 113: 123-31.
- [118] Schiller, J., Müller, K., Süß, R., Arnhold, J., Gey, C., Herrmann, A., Leßig, J., Arnold, K., 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.
- [119] Schiller, J., Süß, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Leßig, J., Müller, M., Petković, M., Spalteholz, H., Zschörnig, O., Arnold, K. (2004): Matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog Lipid Res* 43: 449-88.
- [120] Schiller, J., Süß, R., Fuchs, B., Müller, M., Zschörnig, O., Arnold, K. (2007): MALDI-TOF MS in lipidomics. *Front Biosci* 12: 2568-79.
- [121] Schiller, J.S. (2007): The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose? *Eur Biophys J* 36: 517-527.
- [122] Sebastian, S.M., Selvaraj, S., Aruldas, M.M., Govindarajulu, P. (1987): Pattern of neutral and phospholipids in the semen of normospermic, oligospermic and azospermic men. *J Reprod Fertil* 79: 373-8.
- [123] Seethalakshmi, L., Menon, M., Diamond, D. (1987): The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol* 138: 190-4.
- [124] Sies, H. (1991): Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91: 31-38.
- [125] Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-31.
- [126] Spandorfer, S.D., Kump, L., Goldschlag, D., Brodtkin, T., Davis, O.K., Rosenwaks, Z. (2004): Obesity and in vitro fertilization: negative influences on outcome. *J Reprod Med* 49: 973-7.
- [127] Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Dixon, C.E., Long, J.B., Kochanek, P.M., Pitt, B.R., Bayir, H., Kagan, V.E. (2012): Mapping of phospholipids by MALDI imaging (MALDI-MS): realities and expectations. *Chem Phys Lipids* 165: 545-62.
- [128] Steinberger, E (1971): Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol Rev* 51: 1-22.

- [129] Strezezek, J., Wysocki, P., Kordan, W., Kuklinska, M., Mogielnicka, M., Soliwoda, D., Fraser, (2005): Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol* 5: 279-90.
- [130] Stryer, L. (1987): The molecules of visual excitation. *Sci Am* 257: 42-50.
- [131] Stryer, L. (1988): Molecular basis of visual excitation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53: 283-94.
- [132] Sun, G., Yang, K., Zhao, Z., Guan, S., Han, X., Gross, R.W. (2008): Matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of cellular glycerophospholipids enabled by multiplexed solvent dependent analyte-matrix interaction. *Anal Chem* 80: 7576-85.
- [133] Teuber, K., Schiller, J., Jakop, U., Lüpold, S., Orledge, J.M., Blount, J.D., Royle, N.J., Hoodless, A., Müller, K. (2011): MALDI-TOF mass spectrometry as a simple tool to determine the phospholipids composition of sperm: pheasant spermatozoa as one selected example. *Anim Reprod Sci* 123: 270-8.
- [134] Thompsen, D. (1999): Lifetime health and economic consequences of obesity. *Arch Intern Med* 159: 2177-83.
- [135] Tunc, O., Bakos, H.W., Tremellen, K. (2011): Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia* 43: 121-8.
- [136] Victor, V.M., Rocha, M., Sola, E., Banuls, C., Garcia-Malpartida, K., Hernandez-Mijares, A. (2009): Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 15: 2988-3002.
- [137] Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P. (2003): Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 28: 1-39.
- [138] Vincent, H.K., Innes, K.E., Vincent, K.R. (2007): Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab* 9: 813-39.
- [139] Visconti, P.E., Ning, X., Fornes, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A., Kopf, G.S. (1999): 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.
- [140] Wenk, M.R. (2005): The emerging field of lipidomic. *Nat Rev Drug Discov* 4: 594-610.
- [141] Wenzel, H. (2003): Definition, Klassifikation und Messung der Adipositas. Blackwell-Wissenschaftsverlag, Berlin, Wien 2: 47-62.
- [142] WHO Laborbuch, 5. Ausgabe von 2010

- [143] Yamaii-Hasegawa, A., Tsujimoto, M. (2006): Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. *Biol Pharm Bull* 29: 1547-53.
- [144] Yanagimachi, R. (1994): Mammalian fertilization. *Physiol Reprod* 189-317.
- [145] Yao, Z.M., Vance, D.E. (1989): Head group specificity in the requirement of phosphatidylcholine biosynthesis for very low density lipoprotein secretion from cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 264: 11373-80.
- [146] Younsi, M., Quiliot, D., Al-Makdissy, N., Delbachian, I., Drouin, P., Donner, M., Ziegler, O. (2002): Erythrocyte membrane phospholipid composition is related to hyperinsulinemia in obese nondiabetic women: effects of weight loss. *Metabolism* 51: 1261-8.
- [147] Zalata, A.A., Christophe, A.B., Depuydt, C.E., Schoonjans, F., Comhaire, F.H. (1998): White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int J Androl* 21: 154-62.
- [148] Zanetti, S.R., Monclus, Mde. L., Rensetti, D.E., Fornés, M.W., Aveldaño, M.I. (2010): Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. *Biochimie* 92: 1886-94.
- [149] Zeisel, S.H. (1993): Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. *FASEB J* 7: 551-7.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Promotionsarbeit selbständig angefertigt habe. Dabei wurden keine unzulässigen oder anderen als die angegebenen Hilfsmittel in Anspruch genommen. Direkt oder indirekt aus fremden Quellen gewonnene Informationen wurden als solches kenntlich gemacht. Die Auswertung des Materials sowie die Herstellung des Manuskripts erfolgten selbstständig und ohne fremde Hilfe.

Bislang habe ich mich noch keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen. Die Dissertation wurde weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung weder der medizinischen Fakultät noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt. Es wurden alle Personen benannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, 24.02.2014

LEBENS LAUF

Persönliche Informationen

Name: Kristin Zschörnig, geborene Bresler
Geburtstag: 16.05.1983
Geburtsort: Leipzig
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung

Sept. 1989 – Aug. 1994 108. Grundschule, Leipzig
Sept. 1994 – Juni 2002 Gustav-Theodor-Fechner Gymnasium, Leipzig
Abschluss: Abitur
Okt. 2003 - März 2004 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Apr. 2004 – Dez. 2008 Studium der Biologie an der Universität Leipzig
Abschluss: Diplom-Biologin

Beruf

Jan. 2009 – Juni 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare
Diagnostik, Leipzig
Juli 2009 – Sept. 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Medizinische Physik und Biophysik, Leipzig
seit Okt. 2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin zum Zwecke der
Promotion am Institut für Medizinische Physik und
Biophysik, Leipzig

PUBLIKATIONEN

- [1] Ceglarek, U., Leichtle, A., Brügel, M., Kortz, L., Brauer, R., Bresler, K., Thiery, J., Fiedler, G.M. (2009): Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics. *Mol. Cell. Endocrinol.* 301, 266-71.
- [2] Bresler, K., Pyttel, S., Paasch, U., Schiller, J. (2011): Parameters affecting the accuracy of the MALDI-TOF MS determination of the phosphatidylcholine/ lysophosphatidylcholine (PC/LPC) ratio as potential marker of spermatozoa quality. *Chem. Phys. Lipids* 164, 696-702.
- [3] Fuchs, B., Bresler, K., Schiller, J. (2011): Oxidative changes of lipids monitored by MALDI-MS. *Chem. Phys. Lipids* 164, 782-95.
- [4] Pyttel, S., Zschörnig, K., Nimpsch, A., Paasch, U., Schiller, J. (2012): Enhanced lysophosphatidylcholine and sphingomyelin contents are characteristic of spermatozoa from obese men - A MALDI mass spectrometric study. *Chem. Phys. Lipids* 165, 861-865.
- [5] Wegener, J., Zschörnig, K., Onischke, K., Fuchs, B., Schiller, J., Müller, K. (2013): Conservation of honey bee (*Apis mellifera*) sperm phospholipids during storage in the bee queen – A TLC/ MALDI-TOF MS study. *Exp. Gerontol.* 48, 213-222.
- [6] Nimpsch, A., Fuchs, B., Süß, R., Zschörnig, K., Jakop, U., Goeritz, F., Schiller, J., Müller, K. (2013): A simple method to identify ether lipids in spermatozoa samples by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 6675-82.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Jürgen Schiller für die umfassende Betreuung der vorliegenden Doktorarbeit bedanken. Ohne seine Unterstützung und Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Daniel Huster und dem gesamten Institut für Medizinische Physik und Biophysik und besonders der AG Schiller für die gute Arbeitsatmosphäre und Unterstützung.

Auch bedanke ich mich bei Herrn Prof. Paasch und Susanne Pyttel aus der Andrologie, Leipzig für die Bereitstellung der humanen Spermien/ Seminalplasma und die sehr angenehme Kooperation.

Anschließend bedanke ich mich auch bei Dr. Müller und ihrer Arbeitsgruppe aus dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (Berlin) für die Bereitstellung tierischer Spermien und der guten Zusammenarbeit.

Desweiteren bedanke ich mich bei der AG von Herrn Prof. Dr. Gebhardt für die Bereitstellung der Mäusehoden und Nebenhoden.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) (Projekt Schi 476/12-1).

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für den Beistand in allen Lebenslagen.

Doch der größte Dank gilt meinen beiden Kindern Emil und Lotti und vor allem meinem Ehemann Fridolin, der mir immer zur Seite stand, für alle Probleme ein offenes Ohr hatte und mich immer wieder ermutigt hat.

DANKE