

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. O. Braun-Falco

MIKRO-DISK-ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNG
MÄNNLICHER GENITALSEKRETE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Elmar Perwein
aus München

München 1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Diese Arbeit ist all denen gewidmet, die mein
Leben mit Rat und Tat prägten und förderten
und die geholfen haben, es mit Sinn und Freu-
de zu erfüllen.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. W.-B. Schill
Mitberichterstatter: Prof. Dr. O. Braun - Falco
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.1980

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

=====

1.	E i n l e i t u n g =====	1
2.	L i t e r a t u r ü b e r s i c h t =====	1
2.1.	Andrologische Spermaplasmadiagnostik	1
2.2.	Polyacrylamidgelelektrophorese	3
2.2.1.	Bisheriger Anwendungsbereich	3
2.2.2.	Theoretische Grundlagen der Ionen-Diskontinuität	4
2.2.3.	Konzentrationsgradient und Mikro-Elektrophorese	7
2.3.	Bisherige Ergebnisse der Elektrophorese von Spermaplasma	7
2.4.	Ziel der vorliegenden Arbeit	8
3.	M a t e r i a l u n d M e t h o d i k =====	8
3.1.	Chemikalien, Farbstoffe und Instrumente	8
3.2.	Untersuchungsmaterialien	10
3.3.	Homogenisation von Gewebe	11
3.4.	Kapillarenreinigung	13
3.5.	Herstellung der Mikropipetten	15
3.6.	Herstellung der Aufbewahrungsröhrchen für die Gele	15
3.7.	Mikro-Disk-Elektrophorese	16
3.7.1.	Stammlösungen	16
3.7.2.	Gelherstellung	17
3.7.3.	Elektrophoresetechnik	19
3.7.4.	Färbung, Differenzierung und Aufbewahrung der Gele	22
3.7.5.	Densitometrie	22
3.7.6.	Bestimmung des Rf-Wertes	23
3.8.	Gradientengelelektrophorese im Mikromaßstab	23
3.8.1.	Stammlösungen	24
3.8.2.	Gelherstellung	24
3.8.3.	Elektrophoresetechnik	25

3.9.	Isoelektrische Fokussierung	28
3.10.	Gelatinolyse	29
3.11.	Berechnungsgrundlagen für die durchgeführten Korrelationen	30
4.	E r g e b n i s s e =====	33
4.1.	Bestimmung der optimalen Gelkonzentration	33
4.1.1.	Der Weg zur Gradientengel-Elektrophorese	33
4.1.2.	Isoelektrische Fokussierung im Mikromaßstab	39
4.2.	Gradientengel-Elektrophorese	40
4.2.1.	Albumin	40
4.2.2.	Blutserum	41
4.2.3.	Spermaplasma	42
4.3.	Identifikation einzelner Proteinbanden	42
4.3.1.	Zumischung am Spermaplasma	42
4.3.2.	Gelatinolyse	45
4.3.3.	Molekulargewichtskorrelation mit Albumin	46
4.3.4.	Molekulargewichtskorrelation mit Spermaplasma	50
4.3.5.	Zumischung am Prostataexprimat	53
4.3.6.	Molekulargewichtskorrelation mit Prostataexprimat	54
4.4.	Elektrophorese der einzelnen Genitalsekrete	56
4.4.1.	Prostataexprimat	56
4.4.1.1.	Prostatitis	56
4.4.1.2.	Prostatakarzinom	58
4.4.2.	Hodengewebe	58
4.4.3.	Spermatozoen	59
4.4.4.	Spermaplasma - Zuordnung der Proteinbanden des Spermaplasmas zu den einzelnen Genitalsekreten	59
4.4.4.1.	Einfluß der Vasektomie auf das Proteinmuster des Spermaplasmas	59
4.4.4.2.	Untersuchungen am Splitejakulat	61
4.4.5.	Spermatozelenflüssigkeit	66
4.4.6.	Ductus deferens - Sekret	67
4.4.7.	Bläschendrüsensekret	67
4.5.	Androgenabhängigkeit der Spermaplasmaproteine	69
4.5.1.	Antiandrogentherapie	69
4.5.2.	Gonadotropinsubstitutionstherapie	73

5.	D i s k u s s i o n =====	76
5.1.	Leistungsvermögen der Mikrotechnik	76
5.1.1.	Einführung	76
5.1.2.	Elektrophorese hochgereinigter Proteine	77
5.1.3.	Blutserumelektrophorese und Spermaplasmaelektrophorese	77
5.2.	Optimierung der Trennergebnisse	80
5.2.1.	Technische Details der Elektrophorese	80
5.2.2.	Bestimmung der optimalen Gelkonzentration	83
5.2.3.	Optimale Elektrophoresetechnik	85
5.2.3.1.	Gradientengel-Elektrophorese	85
5.2.3.2.	Isoelektrische Fokussierung	87
5.3.	Identifizierung einzelner Banden	89
5.3.1.	Spermaplasma	89
5.3.1.1.	Zumischung von definierten Proteinen	89
5.3.1.2.	Gelatinolyse	89
5.3.1.3.	Molekulargewichtskorrelation	91
5.3.2.	Prostataexprimat	92
5.3.2.1.	Zumischung von definierten Proteinen	92
5.3.2.2.	Molekulargewichtskorrelation	93
5.4.	Elektrophoretische Proteinmuster der Genitalsekrete und Zuordnung der Spermaplasmaproteine zu den einzelnen akzessorischen Genitalorganen	93
5.5.	Androgenabhängigkeit der Spermaplasmaproteine	98
5.5.1.	Antiandrogentherapie	98
5.5.2.	Gonadotropinsubstitutionstherapie	99
6.	Z u s a m m e n f a s s u n g =====	100
7.	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s =====	103

Verzeichnis der Abbildungen:

Abb. 1	S. 12	Abb. 21	S. 57
Abb. 2	S. 12	Abb. 22	S. 57
Abb. 3	S. 14	Abb. 23	S. 58
Abb. 4	S. 14	Abb. 24	S. 59
Abb. 5	S. 21	Abb. 25	S. 60
Abb. 6	S. 25	Abb. 26	S. 61
Abb. 7	S. 34	Abb. 27	S. 62
Abb. 8	S. 37	Abb. 28	S. 63
Abb. 9	S. 40	Abb. 29	S. 64
Abb. 10	S. 41	Abb. 30	S. 65
Abb. 11	S. 42	Abb. 31	S. 66
Abb. 12	S. 43	Abb. 32	S. 67
Abb. 13	S. 44	Abb. 33	S. 68
Abb. 14	S. 45	Abb. 34	S. 68
Abb. 15	S. 46	Abb. 35	S. 70
Abb. 16	S. 48	Abb. 36	S. 71
Abb. 17	S. 53	Abb. 37	S. 72
Abb. 18	S. 54	Abb. 38	S. 73
Abb. 19	S. 55	Abb. 39	S. 75
Abb. 20	S. 56		

Verzeichnis der Tabellen:

Tab. 1	S. 35	Tab. 5	S. 38
Tab. 2	S. 36	Tab. 6	S. 47
Tab. 3	S. 36	Tab. 7	S. 49
Tab. 4	S. 38	Tab. 8	S. 65

Abkürzungen

g	Erdbeschleunigung
I	elektrische Stromstärke
HA	Humanalbumin
N	Leistung
O.D.	optische Dichte
p	Fehlerwahrscheinlichkeit
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
r	Korrelationskoeffizient
R	elektrische Widerstand
RA	Rinderalbumin
s	Standardabweichung
SDS	sodium dodecylsulfate
T	Gelkonzentration
T_{μ}	Bei der Gelkonzentration T_{μ} erfolgt keine elektrophoretische Trennung zweier Proteine
T_{max}	Bei der Gelkonzentration T_{max} erfolgt maximale elektrophoretische Trennung zweier Proteine
T_{opt}	Bei der Gelkonzentration T_{opt} ist das Trennergebnis bei der Elektrophorese zweier Proteine optimal
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N-N-N'-N'-Tetra-Methyl-Äthylen-Diamin
UV	Ultraviolett
z	Wert des Korrelationskoeffizienten nach z-Transformation

1. EINLEITUNG

=====

Eine Erweiterung der biochemischen Untersuchungen im Rahmen der Diagnostik männlicher Fertilitätsstörungen wurde in den letzten Jahren immer wieder gefordert, um gegebenenfalls gezieltere Aussagen über pathophysiologisch relevante Veränderungen in der Zusammensetzung der Genitalsekrete zu ermöglichen. Für Diagnostik und Therapie ist dabei auch die Proteinzusammensetzung der männlichen Genitalsekrete von Bedeutung.

Um sie zu untersuchen, bietet sich die Polyacrylamidgelelektrophorese an. Da beispielsweise Prostataexplantat oder das Gewebe einer Hodenbiopsie nur wenig Untersuchungsmaterial darstellen, empfiehlt sich die Anwendung einer möglichst empfindlichen Mikromethode. Es wurden daher verschiedene Mikro-Elektrophorese-Systeme hinsichtlich ihrer Eignung für die Analyse männlicher Genitalsekrete überprüft.

2. LITERATURÜBERSICHT

=====

2.1. Andrologische Spermaplasmdiagnostik

In den Kulturländern der Erde bleiben etwa zehn bis zwanzig Prozent der Ehen kinderlos (NIKOLOWSKI, 93). Ca. ein Drittel der Störungen betrifft beide Partner und jeweils ein weiteres Drittel ist durch Infertilität der Frau bzw. des Mannes bedingt (SCHILL, 124). Etwa 500 000 Männer dürften in der Bundesrepublik Deutschland sub- bzw. infertil sein (BRAUN-FALCO, 7).

Die Ursache von Fertilitätsstörungen läßt sich häufig durch die Anamnese, durch den klinischen Befund und die Ejakulatuntersuchung sowie durch Hormondiagnostik und Hodenbiopsie feststellen. Am häufigsten liegt eine Oligozoospermie vor (SCHILL, 124). In einer Reihe von Fällen kann jedoch nur die chemisch-biochemische Untersuchung des Spermaplasmas die Ursache einer Fertilitätsstörung klären. Solchen Untersuchungen

kommt in Zukunft eine große diagnostische Bedeutung zu (ELIASSON 14). Chemisch-biochemische Analysen sind vor allem notwendig für das Studium der sekretorischen Funktion der männlichen Adnexdrüsen. JOEL (49) schlug vor, die Wasserstoffionenkonzentration des Spermaplasmas bei der Differentialdiagnose der Azoospermie zu verwenden. Bei Verschluß bzw. Aplasie der ableitenden Samenwege im Bereich des distalen Ductus deferens liegen saure pH-Werte von 6,3 bis 6,5 vor und entsprechen im wesentlichen dem Prostatasekret, während sie bei der exkretorischen Insuffizienz im Normbereich (7,0 bis 7,8) liegen.

Eine postpuberale Leydigzellinsuffizienz ist nur durch die erniedrigte Spermaplasmafruktose bei im übrigen normalen Spermio-grammbefunden diagnostizierbar (SCHIRREN, 139). Bei Diabetikern wurde eine verminderte Spermaplasmafruktose bei im übrigen normalen Parametern des Spermio-grammes als ein wichtiges Frühsymptom einer inkretorischen Hodenfunktionsstörung bezeichnet (KIESSLING, 55).

Die Funktion der Prostata läßt sich durch die Messung von saurer Phosphatase und Zitronensäure im Spermaplasma beurteilen. Das Maß der Phosphatasebildung in der Prostata korreliert mit der inkretorischen Funktion des Hodens. Ein fehlender Ejakulatgeruch kann mit erniedrigten Phosphatasewerten einhergehen. Auch Motilitätsstörungen treten bei niedrigen Phosphatasewerten gehäuft auf, während pathologische Spermatozoenformen mit einer Erhöhung oder Erniedrigung der Phosphatasewerte einhergehen können (SCHIRREN, 139). Eine Insuffizienz der Bläschendrüse läßt sich durch erniedrigte Fruktose- und Trypsinhemmstoffkonzentration erkennen (SCHILL, 122). Carnitin ist als biochemischer Marker für das Nebenhodensekret von Interesse.

Die Anwesenheit proteolytischer Aktivität im Spermaplasma (HUGGINS und NEAL, 44, LUNDQUIST, 65, LUNDQUIST et al., 66) ist schon länger bekannt. ZANEVELD et al. (169) untersuchten die Eigenschaften von Spermaplasmaproteasen. Semin in wurde von SUOMINEN und NIEMI (153), SUOMINEN et al. (154), SYNER und MOGHISSI (156), FRITZ et al. (27) und SUOMINEN (152) charakterisiert.

SCHILL (120, 126, 127) und SCHILL et al. (136, 137) untersuchten die Bedeutung des Akrosins, dessen Aktivität mit der Befruchtungsfähigkeit einer Spermatozoenpopulation korrelieren soll. Für Routinezwecke läßt sich diese Beziehung bisher noch nicht verwenden. SCHILL (123, 128) gab auch eine zusammenfassende Darstellung anderer Proteinase, die im männlichen Genitaltrakt vorkommen. So spielen Proteinase vor allem für die Spermagerinnung und -verflüssigung eine große Rolle. Die Kenntnis der Menge und Verteilung der Spermaplasmabestandteile ist wichtig, um den Mechanismus der menschlichen Samenkoagulation und -verflüssigung erklären zu können (TAUBER, 158), an der mehrere proteolytische Enzyme beteiligt sind (MANN, 68, SYNER und MOGHISSI, 155). Die einzelnen Komponenten, welche die Koagulation und Verflüssigung bewirken, konnten noch nicht identifiziert werden. Die Abwesenheit von Plasminogen, Prothrombin, Fibrinogen und Faktor XIII im Spermaplasma weist auf die Verschiedenheit zwischen Koagulation und Verflüssigung des Spermas auf der einen Seite und der Blutgerinnung und Fibrinolyse andererseits hin (TAUBER, 158).

HORNSTEIN und HOFMANN (43) fanden eine signifikante Korrelation zwischen erhöhter Spermaviskosität, Verzögerung der Verflüssigung und dem Auftreten von Agglomerationen von Spermatozoen, die vor allem bei Patienten mit chronischer Prostatitis gehäuft vorkommen. Zusatz von alpha-Chymotrypsin (5 mg) zu einem derartigen Ejakulat führt zu einer schnellen Verflüssigung (SCHILL, 128).

Die Proteasen können möglicherweise auch am Spermatozoentransport im Zervikalmukus beteiligt sein (MOGHISSI und SYNER, 77).

SCHILL (129-135) untersuchte die Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems für die Aufrechterhaltung der Regulation der Spermatozoenmotilität.

2.2. Polyacrylamidgelelektrophorese

2.2.1. Bisheriger Anwendungsbereich

Als eine Möglichkeit zur Erforschung der Proteinzusammensetzung der männlichen Genitalsekrete bietet sich die Elektrophorese an.

Die Elektrophorese von Proteinen, bei der eine Trennung vor allem auf Grund von unterschiedlicher Molekülgröße und unterschiedlicher Ladung erfolgt, wurde ursprünglich auf Papier, Zelluloseazetat oder im Stärkegel durchgeführt. RAYMOND und WEINTRAUB (106) verwendeten erstmals die Polyacrylamidgelelektrophorese, bei der als Trägersubstanz Polyacrylamid dient. Sie ist inzwischen eine weit verbreitete Methode und dient z.B. in der Klinik zum Nachweis von Paraproteinen bei Plasmocytom. Bei Neoplasmen der Atemwege, des Magens oder des weiblichen Genitaltraktes sowie bei primär chronischer Polyarthrit und Glomerulonephritis sind die Haptoglobine erhöht (HOFFMEISTER und SCHÜTT, 42), was durch die Polyacrylamidgelelektrophorese leicht nachweisbar ist.

Die Trägersubstanz Polyacrylamid ist durchsichtig, mechanisch stabil, chemisch inert, nicht ionisch (im Gegensatz etwa zum Stärkegel), stabil über weite pH-Bereiche und unlöslich in den zur Elektrophorese verwendeten Lösungen. Durch Veränderungen in den Konzentrationen der Stammlösungen läßt sich die Porenweite beeinflussen, auch der Vernetzungsgrad ist in weiten Grenzen variabel.

Das Polyacrylamidgel besteht aus

- a) Acrylamid als Monomer
- b) N-N'-Methylenbisacrylamid als Comonomer
- c) TEMED (Tetra-Methyl-Äthylen-Diamin) und Ammoniumperoxydisulfat oder Riboflavin und UV-Licht als katalytische Redoxsysteme zur Herstellung freier Radikale
- d) Puffer zur pH-Einstellung
- e) ferner bei der Arbeit im Mikromaßstab zusätzlich Detergens (Triton X-100), damit sich die Gele wieder aus den Glasröhrchen entfernen lassen.

2.2.2. Theoretische Grundlagen der Ionen-Diskontinuität

RAYMOND und WEINTRAUB (106) benutzten für ihre Polyacrylamidgelelektrophorese ein homogenes Puffersystem. ORNSTEIN (96) und DAVIS (10) führten erstmals ein diskontinuierliches Puffersystem ein (s. Abb. 5), das auf den theoretischen Überle-

gungen von KOHLRAUSCH (57) basiert. Im Prinzip handelt es sich dabei um folgenden Vorgang:

Zwei Lösungen mit gemeinsamen Kationen, aber Anionen unterschiedlicher Beweglichkeit seien übereinandergeschichtet. Die Lösung mit dem beweglicheren Anion sei konzentrierter und befinde sich unten. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes wandern diese Anionen dann in ganz definierter Weise, nämlich mit konstanter Geschwindigkeit und unter Bildung einer scharfen Grenze. Für ihre Konzentration und Bewegungsweise gilt dabei, daß sie unabhängig von den vorher herrschenden Verhältnissen nach einer gewissen Zeit die "beharrliche Funktion" nach KOHLRAUSCH (57) erfüllen. Wie für die anionische Diskontinuität beschrieben, stellen sich die gleichen Ergebnisse analog bei der kationischen Diskontinuität ein.

ORNSTEIN (96) und DAVIS (10) benutzten nun einen diskontinuierlichen Spannungs- und pH-Gradienten und unterschiedliche Porengröße im Gel zur Erzeugung der vorausgesetzten Bedingungen. Der Elektrophoresepuffer enthält ein langsames "trailing ion", der Gel- und Probenpuffer ein schnelleres "leading ion". Während der Elektrophorese verdrängt das "trailing ion" das "leading ion" und konzentriert die Komponenten der Probe wie ein Sandwich zwischen den Pufferfronten. Die Ionen der einzelnen Komponenten (die zu trennenden Proteine) werden scharf begrenzt und konzentriert (fokussiert) und nach ihrer Beweglichkeit geordnet, zuerst die schnellsten, am Schluß die langsamsten Ionen. Ganz vorne wandert das "leading ion", ganz hinten das "trailing ion" (RICHTER-LANDSBERG, 108).

Die Konzentration der Ionen hängt von der Konzentration des "leading ions" ab. Wegen der niedrigen Rate Ladung zu Gewicht der Proteine müssen sie konzentriert wandern, und zwar so, daß jedes Protein in seiner Unterzone so viel Ladung transportieren kann, wie die (Sulfat- und Glycin-) Pufferfronten. Die Proteinzone besteht also aus dünnen, konzentrierten Scheiben aller Proteinspezies, geordnet nach steigender Beweglichkeit.

Würde z.B. ein schnelleres Protein zurückfallen in eine Zone mit langsamer beweglichen Proteinen, so wäre dort die elektrische Feldstärke infolge der dort vorhandenen geringeren Leit-

fähigkeit höher. (Nach dem Ohm'schen Gesetz $U = RI$ muß die Stromstärke I über die ganze Länge des Geles konstant sein). Es würde beschleunigt werden, bis es wieder in seiner richtigen Zone wanderte. Würde es sich umgekehrt zu weit vorne befinden, so wäre dort infolge höherer Leitfähigkeit die elektrische Feldstärke geringer. Es würde gebremst, bis es ebenfalls wieder in seiner richtigen Zone wanderte. Die gleichen Überlegungen gelten für die "leading" und "trailing ions".

Der beschriebene Vorgang wurde als "steady state stacking" bezeichnet (ORNSTEIN, 96) und geht in einem stabilisierenden Medium vor sich, wozu im allgemeinen ein niederprozentiges Polyacrylamidgel mit großen Poren verwendet wird (s. Abb. 5). Dieses niederprozentige Gel (meist 5 %) hat keine Sieb- und keine Trenneigenschaften und heißt "stacking gel" oder "spacer gel". Direkt anschließend folgt das Trenngel mit hoher Gelkonzentration und kleinen Poren. Hier erniedrigt sich plötzlich die Beweglichkeit der großen Proteinmoleküle. Durch den pH-Sprung von 6,7 im "spacer gel" auf 8,8 im Trenngel wird das "trailing ion" (Glycin) stärker geladen und wesentlich schneller. Die scharfen Grenzen lösen sich auf, und die Gesetze der kontinuierlichen Elektrophorese treten in Kraft.

Die Methode hat den Vorteil, daß die Startzone der Proteine zu Beginn der Trennung außerordentlich scharf ist. Die einzelnen Komponenten bilden im zylindrischen Gel sogenannte "discs" mit minimaler Dicke (ca. $20 \mu\text{m}$). Diese gaben dem Elektrophoresesystem den Namen "Disk"-Elektrophorese. Die mathematische Grundlage der Disk-Elektrophorese wurde von KOHLRAUSCH (57), ORNSTEIN (96), JOVIN (50-52) und RICHTER-LANDSBERG (108) in allen Einzelheiten beschrieben.

ALLEN (2) veröffentlichte ein Elektrophoresesystem, das auf dem "principle of conductivity shift" (POULIK, 101) und der "moving boundary technic" nach KOHLRAUSCH's "beharrlicher Funktion" beruht. Er benutzt ein diskontinuierliches Puffersystem mit "trailing ion" (Glycin) und "leading ion" (Sulfat), aber mit homogenem pH-Wert im ganzen Gel. Die Beweglichkeit des "trailing ions" ist in diesem System konstant. Eine Schärfung

der Banden erfolgt mit beginnender Auftrennung der Proteinbanden im Trenngel (s. Abb. 6).

2.2.3. Konzentrationsgradient und Mikro-Elektrophorese

Um noch schärfere Trennungen zu erreichen, empfahl MAURER (72) ein Stufengradientensystem mit anionischer Diskontinuität. Polyacrylamidgelelektrophorese im Mikromaßstab wurde erstmals von PUN und LOMBROZO (102) durchgeführt. Die Technik nach ORNSTEIN (96) und DAVIS (10) wurde durch GROBBACH (33), HYDEN (45, 46) und NEUHOFF (78, 81-83), sowie durch NEUHOFF und SCHILL (84), NEUHOFF und LEZIUS (85), NEUHOFF et al. (86-91) und Mc EWEN und HYDEN (19) unter Benutzung der $5 \mu\text{l}$ und $2 \mu\text{l}$ Drummond Micro-Caps zum Einpolymerisieren der Gele verfeinert. Im gleichen Mikromaßstab entwickelte RÜCHEL (117) die Elektrophorese am kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengel mit anionischer Diskontinuität entsprechend ALLEN's (2) System. Diese Mikromethoden sind ebenso trennscharf wie die Makromethoden, beanspruchen wenig Zeit pro Analyse und sind außerordentlich empfindlich. Die untere Nachweisgrenze für eine einzelne Albuminbande liegt im $5 \mu\text{l}$ Gel mit $0,45 \text{ mm}$ Durchmesser bei 10^{-9} Gramm bei Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B (NEUHOFF, 78, 81, 83). Dies bedeutet, daß $0,1$ bis $0,5 \mu\text{g}$ eines Proteingemisches durch Elektrophorese in $5 \mu\text{l}$ Kapillaren aufgetrennt werden können. 5000 bis 10000 Elektrophoreseläufe können also mit 1 ml Proteinlösung, die 1 mg Protein enthält, durchgeführt werden.

2.3. Bisherige Ergebnisse der Elektrophorese von Spermaplasma

Ergebnisse von Spermaplasma-Elektrophoresen liegen bisher nur wenige vor. Mit Hilfe der Papier-, Zelluloseazetatelektrophorese und Geldiffusion konnten sechs bis neun Proteine im Spermaplasma des Menschen nachgewiesen werden (GRAY und HUGGINS, 32, ROSS et al., 113, KELLER und TSCHUMI, 54, SCHNEIDER et al., 144, WEIL et al., 162, HERMAN G., 35, 36, ROA und SADRI, 110, RABACH, 104, ROZIN et al., 114, KLOPSTOCK et al., 56, SEARCY et al., 145). DORN (13) konnte mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese zeigen, daß Spermaplasma pathologischer Ejakulate im allgemeinen keine größeren Abweichungen von der Norm aufweist. Beziehungen

zwischen Spermatozoenanzahl, -motilität, Spermatozytogramm und Eiweißzusammensetzung des Spermaplasmas waren nach seinen Angaben nicht zu verzeichnen. SCHEIRREN (138) bestätigte dies. Auch er konnte nur in ganz wenigen Fällen primärer Hodendysplasie aus dem Elektrophoresebefund eine Aussage ableiten.

GARNER und EHLERS (28), GARNER et al. (29), LAVON und BORSNELL (60) und LAVON et al. (62, 63) arbeiteten mit der Polyacrylamid-gelelektrophorese am Spermaplasma von Rind, Schafsbock und Eber. Menschliches Spermaplasma wurde mit Hilfe der Polyacrylamid-gelelektrophorese von MISCHLER (75), DAVAJAN und KUNITAKE (9) und QUINLIVAN (103) untersucht. In der überwiegenden Zahl der Fälle ließ sich aus der Spermaplasma-Elektrophorese kein diagnostischer Anhalt gewinnen.

2.4. Ziel der vorliegenden Arbeit

Untersuchungen des Spermaplasmas mittels Polyacrylamid-gelelektrophorese im Mikromaßstab bei Verwendung von diskontinuierlichen Puffer-, Spannungs- und Konzentrationsgradienten waren bisher noch nicht erfolgt. Der Einsatz dieser Technik für andrologische Fragestellungen schien uns erfolgversprechend.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der bekannten Mikromethoden der Polyacrylamid-gelelektrophorese die Proteinzusammensetzung der Sekrete und Gewebe des männlichen Genitaltraktes unter den unterschiedlichsten Bedingungen zu untersuchen, um gegebenenfalls diagnostische und prognostische Erkenntnisse zu erzielen.

3. MATERIAL UND METHODIK
=====

3.1. Chemikalien, Farbstoffe und Instrumente

Chemikalien für die Disk-Elektrophorese:

Acrylamid und N-N'-Methylenbisacrylamid vierfach rekristallisiert sowie TEMED (N-N'-N'-N'-Tetra-Methyl-Äthylen-Diamin): Firma BioRAD, München

Ampholine pH 3 - 10, 40 %ig, LKB - Instruments, Gauting		
Ammoniumperoxydisulfat	1201	Merck Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat $K_3Fe(CN)_6$	4973	"
Triton X - 100	8603	"
Hydantoin	8045	"
Trispuffer	8382	"
Glycin	4201	"
Chromschwefelsäure	2499	"
Schwefelsäure p.a.		"
Eisessig p.a.		"
Phosphorsäure p.a.		"
Aceton p.a.		"
Äthanol p.a.		"
Methanol p.a.		"
Eau de Javelle (Kaliumhypochlorit), 25 %ig, Apotheke der Universitätskliniken München		

Standardproteine:

Humanalbumin	Ø RHA 04	Behringwerke W.Germ.
Rinderalbumin	Ø RHD 04	"
Standardblutserum (Batch Nr. 9756)	Ø RDT 02	"
Lactoferrin, Muster		"

Farbstoffe:

Bromphenolblau	8122	Merck Darmstadt
Bromphenolrot	3023	"
Fluorescein	3992	"
Pyronin	7517	"
Amidoschwarz 10 B	1167	"
Coomassie Brillant Blau R 250	12553	"
Lichtgrün	1315	"

Glasmaterial:

Kapillaren: Drummond Micro-Caps 5 µl	Schütt Göttingen
Pyrexglas und AR-Glas	"

Geräte für die Mikro-Disk-Elektrophorese:

Joyce Loebel Mikro-Densitometer MK III C, Double Beam	
Zoom-Stereo-Mikroskop zur Aufsichtsbetrachtung, Zeiss, W.Germ.	
Netzgerät nach NEUHOFF et al. (86)	Schütt Göttingen
Elektrophoreseständer	"
Trichter mit aufsetzbaren, perforierten Gummikappen	"
Pinzetten - biegsam und Präparierpinzetten mit feiner, fester Spitze	"
Ständer für die Mikropipetten	"
Reaktionsgefäße 3810 (Eppendorf)	"
Injektionsspritze zum Ausblasen der Gele	"
Ultrazentrifuge (16 000 g)	"
Mikro-Homogenisator: Behälter mit Pistill und Motor	"
Reinigungsanlage für Micro-Caps (NEUHOFF, 83)	"
Ultraviolettlampe (UV-A)	"
Küvetten zum Betrachten und Mikrodensitometrieren der Gele	"

3.2. Untersuchungsmaterialien

Zur Untersuchung kamen 154 Ejakulate von Patienten der andrologischen Sprechstunde der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor Prof. Dr. O. Braun-Falco). Die Ejakulate wurden nach fünftägiger sexueller Karenz durch Masturbation gewonnen und es wurde eine Spermaanlyse nach den Richtlinien von SCHIRREN (140) durchgeführt. Sie wurden 10 Min. lang bei 16 000 g zentrifugiert und der Überstand im Verhältnis 1 : 6 mit Puffer B' (Lösung B 1 : 8 verdünnt) versetzt (s. 3.8.3.).

Splitejakulate wurden von zwölf gesunden, freiwilligen Probanden mit normalen Spermaparametern gewonnen. Die Spender wurden angewiesen, das Ejakulat in drei Fraktionen aufzufangen. Die ersten beiden Ejakulatstöße bildeten die erste, die nächsten beiden die zweite und der Rest die dritte Fraktion.

Von Spermatozoen wurde ein Extrakt in folgender Weise gewonnen: 10 ml Ejakulat mehrerer Spender wurden zweimal im Wechsel zentrifugiert (10 Min. bei 600 g bzw. 2 100 U/Min.) und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zu dem Sediment, das nach der zweiten Zentrifugation verblieben war, wurde dann 1 ml 4 %iges Triton X - 100 gegeben.

Prostatasekret von 13 Patienten aus der urologischen Ambulanz der Universität München wurde durch Prostatamassage im Labor Prof. Dr. A. Hofstetter, Urologische Klinik der Universität München gewonnen. Vor der Elektrophorese wurde es mit Puffer B' im Verhältnis 1 : 6 verdünnt.

Sekret des Ductus deferens wie auch Spermatozelenflüssigkeit wurden intraoperativ im Rahmen einer Vasektomie gewonnen. (Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. P. Carl, Urologische Poliklinik der Universität München).

Sekret der Bläschendrüse wurde nach Punktion der Drüse mit Glaskapillaren im Verlauf einer Prostataektomie wegen Prostatakarzinom abgesaugt (Prof. Dr. E. Elsässer, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder München).

Hodengewebe stammte von Patienten, bei denen aus diagnostischen Gründen eine Hodenbiopsie durchgeführt worden war. Das frische und unbehandelte Gewebe wurde bis zur Verwendung bei -25 °C aufbewahrt.

3.3. Homogenisation von Gewebe

Die Homogenisation des Hodengewebes erfolgte nach der Methode von NEUHOFF (82, 83). Ein kleiner Pistill mit Kunststoffspitze in zylindrischer Form wurde durch eine Zahnarztbohrmaschine über eine biegsame Welle mit 24 000 U/Min. angetrieben. Die Homogenisation erfolgte in einem Spezialgefäß der Fa. Schütt Göttingen unter Eiswasserkühlung in einem Zeitraum von etwa 30 Sekunden (Abb. 1) nach Zugabe von Lösung B' im Verhältnis 1 : 5 (w : v). Der optimale Arbeitsbereich lag bei 50 µl bzw. 10 mg Gewebe. Bei einer Drehzahl von 24 000 U/Min. wurde der Pistill vertikal langsam auf und ab bewegt, so daß eine vollständige Homogenisation der Gewebspartikel möglich war.

Homogenisationsverfahren

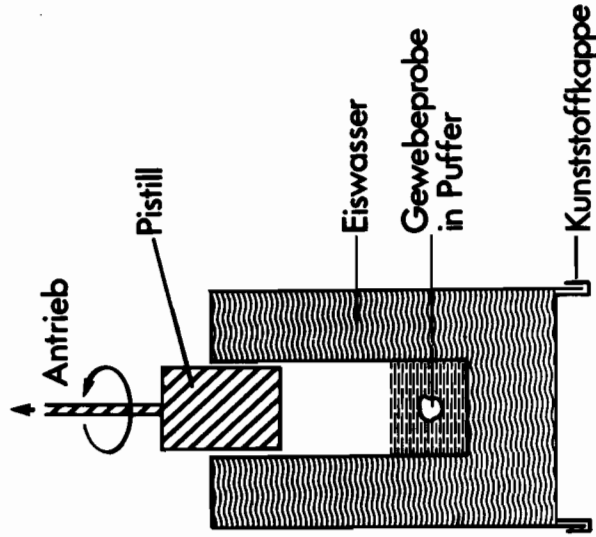


Abb. 1

Reinigung der Micro - Caps (a)

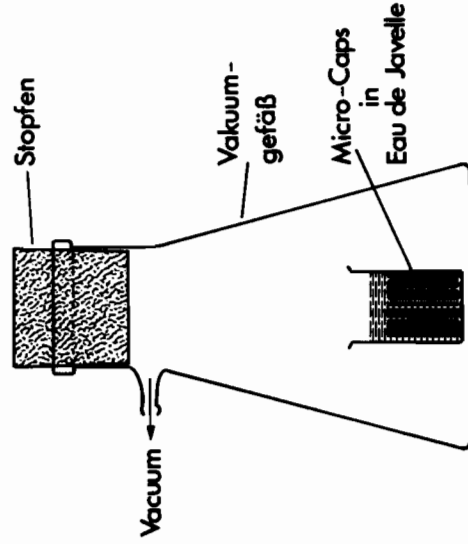


Abb. 2

3.4. Kapillarenreinigung

Neue wie einmal gebrauchte Drummond Micro-Caps mußten vor der Beschickung mit dem Polymerisationsgemisch gereinigt werden (NEUHOFF, 83). Ein kleines Glasgefäß wurde mit den Micro-Caps, die senkrecht oder steil stehen sollen, beschickt, mit Eau de Javelle gefüllt und in das vakuumfeste Sauggefäß gestellt (Abb. 2). Ein magnetischer Zeitschalter, der an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, sorgte für intermittierenden Unterdruck in einer vakuumfesten Saugflasche. Während des intermittierenden Unterdruckes wurden in der Unterdruckphase die entstehenden Luftbläschen abgesaugt, während in der Phase des Normaldruckes die Lösung auf die Micro-Caps bzw. die darin vorhandenen Polyacrylamidgelreste einwirkte. Die Javelle'sche Lauge wurde mehrfach erneuert.

Nach ca. drei- bis vierstündiger Einwirkung der Natriumhypochloritlösung wurden die Micro-Caps mit Aqua dest. gespült und dann wieder in gleicher Anordnung, diesmal aber unter Verwendung von Chromschwefelsäure aufgestellt. Die Anwendung eines ca. zehnmütigen intermittierenden Unterdruckes bewirkte, daß sich die Micro-Caps restlos mit der Chromschwefelsäure füllten, und alle etwa vorhandenen Luftblasen entwichen. Dadurch war eine optimale Reinigung möglich. Auch die Chromschwefelsäure wurde mehrfach gewechselt, die Einwirkungsdauer betrug mindestens 12 Stunden. Danach wurden die Micro-Caps nacheinander in Aqua dest., 96 %igem Äthanol und Aceton p.a. gespült unter Verwendung der in Abb. 3 gezeigten Anlage. Bei geschlossenem Hahn entstand in der Filternutsche ein Unterdruck, der dazu führte, daß alle Luftblasen aus den Micro-Caps entwichen. Bei Spülung mit Äthanol bzw. Aceton führte die Vakuum-Anwendung zum Sieden der Flüssigkeit. Innerhalb der Micro-Caps stiegen Luftblasen nach oben, Flüssigkeit trat unten nach und spülte die Micro-Caps gründlich. Nach Öffnen des Hahnes schoß die Spülflüssigkeit aus dem Vorratsgefäß in scharfem Strahl nach unten und spülte zusätzlich.

Nach Beendigung der Spülvorgänge wurde das Aceton durch die Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die verbliebene Restflüssigkeit im Vakuum verdampft. Danach wurden die Micro-Caps bei einer Temperatur von ca. 180 °C zwei Stunden lang getrocknet, wo-

Pipettenspitzen

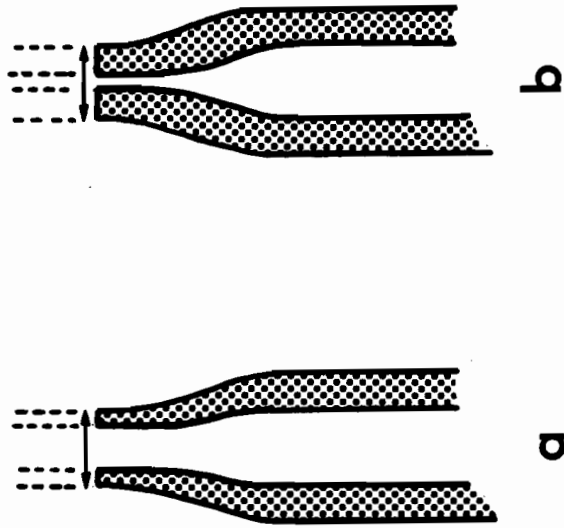


Abb. 4

Reinigung der Micro - Caps (b)

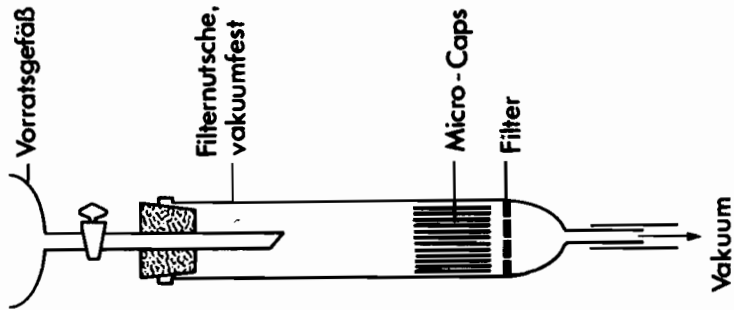


Abb. 3

bei evt. verbliebene organische Reste verkohlten. Derart verunreinigte Micro-Caps wurden verworfen, die übrigen Micro-Caps waren dann gebrauchsfähig.

3.5. Herstellung der Mikropipetten

Um im Lumen der 0,45 mm weiten Micro-Caps arbeiten zu können, waren feine Kapillaren erforderlich, die selbst hergestellt wurden. Glasrohre aus Pyrexglas mit 2 mm Innen- und 4 mm Außendurchmesser wurden mit einem Glasschneider in Stücke von 10 cm Länge geteilt. Scharfe Kanten an den Enden der Röhrchen ließen sich durch Erhitzen in einer Gasflamme glätten. Dann wurde die Mittelpartie unter ständigem Drehen in die Flamme gehalten, bis das Glas gerade eben verformbar war; unmittelbar danach wurde das erhitzte Glasröhrchen aus der Flamme genommen und wenige Millimeter auseinandergezogen. Der so vorbehandelte Teil des Röhrchens wurde erneut in der Flamme gedreht, bei heller Glut entfernt und schnell ohne Abknickung der Enden auseinandergezogen. Voraussetzung war, daß der Gasbrenner eine sehr heiße Flamme und einen sehr feinen Flammenkegel besaß. Anstelle des von NEUHOFF (83) empfohlenen Brenners, der mit Propangas, Sauerstoff und Pressluft arbeitet, wurde ein Azetylen-O₂-Brenner mit kleinem Brenneinsatz verwendet.

Das kurze Vorziehen hatte den Vorteil, daß der Übergang der Pipetten vom Ansatzstück zum kapillären Teil kurz und das Verhältnis zwischen Innen- und Außendurchmesser der gezogenen Kapillaren günstig, d.h. hoch war. Vor Gebrauch wurde von dem kapillären Teil so viel, als nötig war, abgebrochen. (s. Abb. 4).

3.6. Herstellung der Aufbewahrungsröhrchen für die Gele

Zur Aufbewahrung der fertigen Polyacrylamidgele wurden ca. 5 cm lange Glasröhrchen aus AR-Glas (Innen-/Außendurchmesser 2 bzw. 3 mm) verwendet, die einseitig mit dem Azetylenbrenner zugeschmolzen wurden. Um gleichmäßig zugeschmolzene Enden zu erzielen, wurden die zugeschnittenen Glasröhrchen unter ständigem Drehen nur wenig in die Flamme gehalten. Klobige, ungleichmäßige Enden wären unzuweckmäßig, da das Glas dort leicht bricht, die Röhrchen nicht in die Aufbewahrungsständer passen und eine

densitometrische Auswertung nicht möglich wäre. Voraussetzung für die Densitometrie war eine parallele Lagerung der Gele zur Unterlage. Eine Flammeneinstellung mit relativ viel Sauerstoff erwies sich als günstig, um Rußflecken auf den Gläsern zu vermeiden.

3.7. Mikro-Disk-Elektrophorese

3.7.1. Stammlösungen

Für die Herstellung der Polyacrylamidgele wurden die folgenden Stammlösungen angesetzt:

Lösung A	Lösung B
0,86 g Tris-Puffer	2,85 g Tris-Puffer
0,063 ml TEMED	25 ml H ₂ O
3,6 n H ₂ SO ₄ ad pH 8,8	8,7 m H ₃ PO ₄ ad pH 7
H ₂ O ad 10 ml	1 m H ₃ PO ₄ ad pH 6,7
Lösung C	Lösung D'
20 g Acrylamid	1 % Ammoniumperoxydisulfat
0,2 g Bis (N-N'-Methylenbisacrylamid)	in 2 % Triton X - 100
3,75 mg K ₃ Fe(CN) ₆	
H ₂ O ad 37,5 ml	
Lösung E	Lösung F
5,98 g Tris-Puffer	2,7 % Ammoniumperoxydisulfat
50 ml H ₂ O	in 2 % Triton X - 100
0,46 ml TEMED	
8,7 m H ₃ PO ₄ ad pH 7	
1 m H ₃ PO ₄ ad pH 6,7	
H ₂ O ad 100 ml	
Elektrophorese-Puffer	
3,0 g Tris-Puffer	
14,4 g Glycin	
H ₂ O ad 500 ml	
pH 8,4	

Nur bei der Mikro-Disk-Elektrophorese nach ORNSTEIN (96) und DAVIS (10) wurde dem Elektrophoresepuffer ca. 0,5 % Bromphenolblau und Fluoreszein zugegeben.

Farbstofflösungen:

100 mg Bromphenolblau in 5 ml H₂O
Fluoreszein: gesättigte Lösung in H₂O
0,5 % Amidoschwarz 10 B in 7,5 %iger Essigsäure
0,01 % Bromphenolrot in 50 %iger Saccharoselösung

Triton X - 100 wurde zur Entfernung der Gele aus den Micro-Caps benötigt. Es soll eine Konzentration von 1 % im Polymerisationsgemisch nicht überschreiten.

3.7.2. Gelherstellung

Alle Stammlösungen konnten zwei bis drei Monate im Kühlschrank bei 0 °C bis 4 °C gelagert werden. Lösung D' mußte vor Gebrauch mit 2 %iger Triton X - 100 - Lösung so weit verdünnt werden, daß das 20 % Gel in ca. 45 Minuten polymerisierte. D' wurde im Verhältnis 1 : 7 zu einer Lösung D von etwa 0,14 % Ammoniumperoxydisulfatkonzentration verdünnt, wobei die beste Verdünnung durch eine Verdünnungsreihe erhalten wurde. Eine 0,14 %ige Ammoniumperoxydisulfatlösung wäre nicht haltbar und würde schon Stunden bis Tage nach dem Ansetzen an katalysatorischer Wirksamkeit verlieren. D' dagegen war nahezu beliebig haltbar.

K₃Fe(CN)₆ sollte eine bessere und gleichmäßigere Polymerisation bewirken (NEUHOFF, 83), was jedoch nicht von uns reproduziert werden konnte.

Die Monomere Acrylamid und N-N'-Methylenbisacrylamid müssen sehr rein sein. Es empfiehlt sich, eine mehrfache Rekristallisation durchzuführen. Sichtbare Verunreinigungen wurden beseitigt, indem die Lösungen vor Gebrauch erwärmt und 12 Minuten bei 16 000 g ultrazentrifugiert wurden. Die Gele waren dann optisch ganz klar. Allerdings mußten die Monomere der Lösung C vor dem Zentrifugieren ganz gelöst sein, um nicht die ungelösten Kristalle abzuzentrifugieren. Mit sehr gutem Erfolg wurden hochgereinigte, vierfach rekristallisierte Monomere der Firma BioRAD benutzt.

Bei häufigem Erwärmen der Lösung C zum Lösen der Monomere vor Gebrauch entstünde Acrylsäure, welche die Polymerisation und damit den Trennungsvorgang stören würde. Stammlösung C wurde daher in kleinen Portionen eingefroren und gut verschlossen bis zur Verwendung aufbewahrt.

Herstellung des Polymerisationsgemisches:

20 %iges Trenngel:	1,5 ml Stammlösung C
	0,5 ml Stammlösung A
	2,0 ml Stammlösung D
5 %iges "spacer gel":	0,25 ml Stammlösung C
	1,5 ml Stammlösung E
	0,2 ml Stammlösung F
	0,73 ml 2 %ige Lösung Triton X - 100

Die Trennschärfe konnte verbessert werden, indem zu dem Polymerisationsgemisch für das Trenngel 20 mg Hydantoin zugemischt wurden (NEUHOFF, 83).

Durch Eintauchen in das frisch vorbereitete Polymerisationsgemisch für das Trenngel wurden die Micro-Caps zur Hälfte bis zu zwei Drittel gefüllt. Sie wurden anschließend in eine 2 mm dicke Plastilinschicht senkrecht gestellt, um sie unten fest zu verschließen. Mit Hilfe der selbstgezogenen Kapillarpipetten wurde das Polymerisationsgemisch in den Micro-Caps mit Aqua dest. überschichtet. Dabei durfte keinesfalls die Pipette in das Polymerisationsgemisch eingetaucht werden, aber auch nicht zu weit entfernt sein, da sich sonst im einen Fall die beiden Lösungen zu stark vermischten und im anderen Fall Luftblasen entstanden. Das Überschichten mit Wasser war entscheidend für die Qualität der Trenngelkuppe und damit für die Trennqualität.

Sämtliche Manipulationen mit den Micro-Caps wurden unter einem Zeiss-Stereo-Mikroskop zur Aufsichtsbetrachtung bei 8 - bis 10 - facher Vergrößerung durchgeführt.

Nach dem Überschichten mit Wasser wurden die Micro-Caps senkrecht in eine feuchte Kammer gestellt. Nach ca. 45 Minuten war der Polymerisationsvorgang in Abhängigkeit von der Konzentration der Lösung D vollständig abgeschlossen. Vor Einsatz

der Gele sollten diese jedoch wenigstens 10 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden haben. Die Verwendungsfähigkeit betrug zwei bis drei Tage.

Vor der Elektrophorese wurde das überschichtete Wasser aus den Micro-Caps abgesaugt. Eine Verletzung der Gelkuppe mußte streng vermieden werden. Danach wurde das Polymerisationsgemisch für das "spacer Gel" aufgetragen (ca. 3 mm). Dies mußte sehr rasch gehen, da das "spacer gel" schon nach ca. 2 Minuten polymerisiert. Auch bei diesem Arbeitsgang mußte die Bildung von Luftblasen vermieden werden. Schließlich wurde mit 1 : 3 verdünnter Lösung B überschichtet, und die Micro-Caps wurden in die feuchte Kammer zurückgestellt. Nach einer Stunde waren die Gele dann einsatzbereit und maximal zwei Tage lang verwendungsfähig.

Das "spacer gel" stellte die pH-Diskontinuität her, wie es ORNSTEIN (96) und DAVIS (10) beschrieben haben und verhinderte wegen seiner elastischen und weichen Konsistenz, daß Proteine in den Zwischenraum zwischen Trenngel und Micro-Cap-Innenwand gelangten.

3.7.3. Elektrophoresetechnik

Die optimale Proteinkonzentration für die Elektrophorese betrug 1 bis 3 mg/ml, davon wurden nach Absaugen der überstehenden Flüssigkeit im Micro-Cap 0,1 bis 1 μ l aufgetragen. 6,4 mm im Micro-Cap entsprachen 1 μ l. Stand nur eine sehr verdünnte Lösung zur Verfügung, so war es möglich, durch das Aufstoken eines weiteren Micro-Caps mehrere Mikroliter Proteinlösung aufzutragen, wobei sich die beiden Micro-Caps durch ein Stück Kunststoffschlauch leicht verbinden ließen (NEUHOFF und SCHILL, 84). Selbst bei Auftragen einer Flüssigkeitssäule von 4 cm Länge erfolgte durch das diskontinuierliche System eine Konzentrierung der Probe auf Bruchteile eines Millimeters. Ein solches aufgestocktes Micro-Cap wurde während der Elektrophorese wieder entfernt, wenn die Proteine (kenntlich an den Farbstoffbanden) das untere Micro-Cap erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich das obere Micro-Cap mit Elektrophoresepuffer gefüllt, der einen sehr hohen elektrischen Widerstand hat. Es würde also nur ein geringer elektrischer Strom fließen, und

damit die Elektrophorese länger dauern und die Trennung unschärfer werden. Blieb nach dem Auftragen der Probe noch freier Raum im Micro-Cap, so wurde mit 1 : 3 verdünnter Lösung B aufgefüllt, wobei Luftblasenbildung vermieden wurde.

Nach der Beschickung der Micro-Caps wurden sie an der Stelle direkt oberhalb des Plastilins mit einem Diamantglasschneider angeritzt, gebrochen und die beiden Teile gegeneinander abgeschert. Das obere Ende des Micro-Caps wurde dann mittels einer perforierten Gummikappe an einem Trichter, oder um Elektrophoresepuffer zu sparen, an einem gekürzten Eppendorf Reaktionsgefäß (3810) befestigt. Der Trichter bzw. das Eppendorf-Gefäß wurde mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt, in den Elektrophoreseständer eingehängt und das freie untere Ende des Micro-Caps in ein kleines, Elektrophoresepuffer enthaltendes Gefäß getaucht. Die Platinelektroden wurden mit dem Netzgerät nach NEUHOFF et al. (86) verbunden, wobei oben die Kathode und unten die Anode angelegt wurden. Die Proteine wanderten dann als Anionen von oben nach unten (Abb. 5).

Das Problem der Spannungskonstanthaltung ist mit Hilfe einer Rauschdiodenschaltung gelöst, eine Spannungs- und Strommessung ist während der Elektrophorese mit Hilfe dreier eingebauter, sehr hochohmiger Röhrenvoltmeter möglich. Für die Mikro-Disk-Elektrophorese ist Spannungsstabilität günstiger als Stromstabilität (NEUHOFF, 78).

An das Netzgerät konnten gleichzeitig 10 Micro-Caps angeschlossen werden. Für die Mikro-Disk-Elektrophorese mit dem System nach ORNSTEIN (96) und DAVIS (10) wurde eine Spannung von ca. 60 - 80 Volt empfohlen. Die Elektrophorese dauerte etwa 30 Minuten. Der Anfangsstrom von ca. 80 μ A sank bis auf ca. 10 μ A gegen Ende der Elektrophorese. War der Strom zu niedrig, deutete das darauf hin, daß Luftblasen in dem betreffenden Cap vorhanden waren.

Die Wanderung der Proteine konnte direkt verfolgt werden. Fluoreszein, das im Elektrophoresepuffer enthalten war, wanderte mit der vorderen Pufferfront und war bei UV-A-Bestrahlung mit einer Ultraviolettlampe als feiner Disk sichtbar. Direkt

dahinter konzentrierten sich im Verlauf des "stacking"-Prozesses die Proteine. Sie wurden durch das Bromphenolblau sichtbar gemacht, ohne ausgefällt zu werden. Es konnte gut beobachtet werden, wie sie sich als feiner "disc" konzentrierten, der direkt hinter der Fluoreszein-Front wanderte.

Nach Ausbildung der sichtbaren "discs" war der "stacking"-Prozess abgeschlossen. Die weitere Wanderung erfolgte dann in Form der Isotachyphorese. Die Trennung der Proteine konnte direkt beobachtet werden. Die Pufferfront, markiert durch das Fluores-

Disk - Elektrophorese

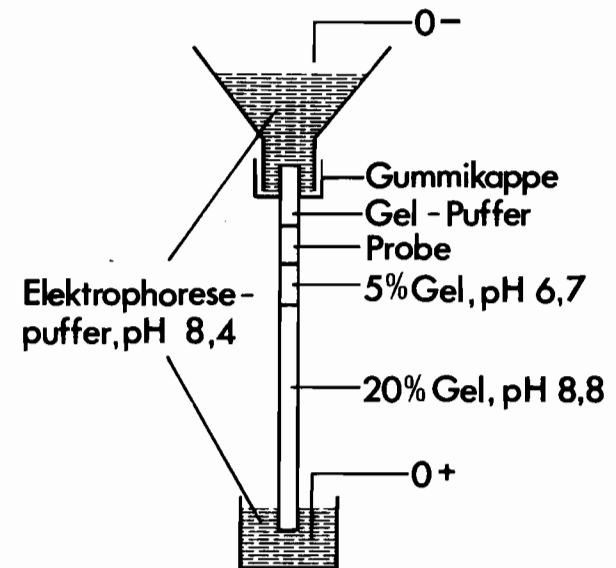


Abb. 5

zein, wanderte als feiner Disk weiter, die blau gefärbten Proteine wurden aufgetrennt und bildeten verschiedene Banden. Nach ca. 30 Minuten war die vorderste Front der Proteine etwa 6 - 8 mm im Trenngel gewandert, die Elektrophorese konnte dann beendet werden.

3.7.4. Färbung, Differenzierung und Aufbewahrung der Gele

Die Gele wurden durch Wasserdruck aus den Micro-Caps herausgepreßt und in die Fixations- und Färbelösung überführt unter Verwendung einer 2 ml - Spritze mit Polyäthylenzwischenstück. Das Fixieren und Färben in 7,5 %iger Essigsäure, die 0,5 % Amidoschwarz 10 B enthielt, dauerte 5 Minuten. Die Gele wurden dann mit Hilfe einer weichen Pinzette in 7,5 %ige Essigsäure überführt. Das Entfärben und Differenzieren der Gele war nach 30 bis 60 Minuten beendet und konnte durch häufiges Umrühren und Erneuern der Essigsäure verkürzt werden.

3.7.5. Densitometrie

Die Betrachtung der Gele erfolgte in einer Spezialküvette unter dem Stereomikroskop. Mit Hilfe des Joyce Loebel Double Beam Mikrodensitometers MK III C wurden Elektropherogramme geschrieben. Aufbewahrt wurden die Gele in AR-Glasröhrchen, in denen sie liegend der Mikrodensitometrie zugeführt wurden.

Die Röhrchen wurden für diesen Zweck mit 7,5 %iger Essigsäure gefüllt, die eine Spur Amidoschwarz 10 B enthielt, damit sich die Gele bei längerer Aufbewahrung nicht entfärbten. Nach Überführen der Gele in die Glasröhrchen wurden ca. 3 mm der Essigsäure abgesaugt und die Röhrchen mit Harvard Glaswachs zugschmolzen, mit Klebe-Ettiketten versehen und beschriftet. Die so konservierten Gele konnten mikrodensitometriert und photographiert werden. Die Densitometrie wurde mit dem Joyce Loebel Double Beam Mikro-Densitometer MK III C mit Graukeil D 588, Graufilter 1,0 O.D., Dämpfung 9, Differential Control 9, Schalterstellung FWD NORMAL, Vergrößerung 1 : 20 und Spalt 90 durchgeführt. Auf den erhaltenen Densitogrammen lagen die niedermolekularen Proteine rechts, die hochmolekularen Proteine links.

3.7.6. Bestimmung des Rf-Wertes

Für die durchgeführten Korrelationsrechnungen mußten die Rf-Werte gemessen werden. Zur Markierung der Pufferfront wurde folgende Methode verwendet:

Unmittelbar im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Micro-Cap an der Stelle, an der die Fluoreszeinbande lag, mit einem Diamant-Glasschneider angeritzt, gebrochen und abgeschert. Bei Verwendung des Stereomikroskopes ließ sich diese Markierung sehr genau vornehmen. Das Ende des Geles war dann bei der Densitometrie als Peak sichtbar (in den abgebildeten Densitogrammen mit E Δ Ende markiert) und entsprach der Pufferfront. Die Berechnung des Rf-Wertes erfolgte nach Messung der Proteinwanderungsstrecke dividiert durch die Wanderungsstrecke der Pufferfront im Trenngel.

3.8. Gradientengelelektrophorese im Mikromaßstab

3.8.1. Stammlösungen

Stammlösung A

3,39 g Tris-Puffer
6 ml 1 n H₂SO₄
0,1 ml TEMED
6 n H₂SO₄ ad pH 8,8
H₂O ad 10 ml

Stammlösung B

wie Lösung A, aber ohne TEMED, wird vor Gebrauch 1 : 8 verdünnt (Molarität 0,39 m Δ 47,19 g/l Tris)

Stammlösung C

20 g Acrylamid
0,4 g N-N'-Methylenbisacrylamid
3,0 mg K₃Fe(CN)₆
H₂O ad 37,5 ml

Stammlösung D'

1 %ige Lösung von Ammoniumperoxydisulfat in 2 % Triton X - 100, vor Gebrauch mit 2 %igem Triton X - 100 ca. 1 : 8 verdünnen

Elektrophoresepuffer

6 g Tris-Puffer
28,8 g Glycin
H₂O ad 1000 ml
pH 8,4

Herstellung der Farbstofflösungen:

- 0,01 % Bromphenolrot in 50 %iger Saccharoselösung
- 0,5 % Amidoschwarz 10 B in 7,5 %iger Essigsäure

Alle Lösungen waren im Kühlschrank bei 0 °C bis 4 °C mehrere Monate haltbar. Sie mußten jedoch vor Gebrauch auf Zimmertemperatur angewärmt werden. Stammlösung D' wurde vor Gebrauch mit 2 %iger Lösung Triton X - 100 ca. 1 : 8 verdünnt. Wird auf Kaliumhexacyanoferrat in Lösung C verzichtet, so kann D' noch stärker verdünnt werden, da dann weniger Katalysator nötig ist.

3.8.2. Gelherstellung

Die Stammlösungen A und C wurden im Verhältnis 1 : 3 gemischt. Das Gemisch war einen Tag haltbar. Die Micro-Caps wurden dann in Lösung D getaucht, wobei mit dem Zeigefinger an der oberen Öffnung des Micro-Caps die Füllung reguliert wurde. Zum Fassen der Micro-Caps wurde eine spezielle Kreuzpinzette mit eingefräster Nut und rechtwinklig angelötetem Markierungsstab verwendet.

Wenn ca. 18 mm gefüllt waren (Markierung am angelöteten Stab), verschloß der Zeigefinger die obere Öffnung des Micro-Caps, und es wurde in Lösung A/C ca. 5 mm senkrecht eingetaucht und ganz gefüllt. Schräges oder tieferes Eintauchen hätte ein schnelleres Einströmen von Lösung A/C zur Folge und würde damit einen weniger steilen Gelgradienten bzw. ein längeres Gel bewirken.

Waren die Micro-Caps gefüllt, mußten sie erschütterungsfrei senkrecht stehen. An der Wand eines kleinen Becherglases, das ca. 3 mm hoch mit 50 %iger Saccharoselösung und einigen Tropfen der Stammlösung D' gefüllt war, wurden sie durch Adhäsion festgehalten. Der Katalysator in der Saccharoselösung bewirkte, daß die Gele bis zum unteren Ende der Micro-Caps durchpolymerisierten.

Die Konzentration von Stammlösung D war durch Verdünnen von D' mit 2 %iger Triton X - 100 - Lösung so eingestellt, daß der Polymerisationsvorgang nach 15 Minuten begann und nach 45 Minuten beendet war. Nach Ablauf von 15 Minuten konnte damit gerechnet

werden, daß in waagrecht Ebene im Micro-Cap die Konzentrationen ausgeglichen waren. Es resultierte ein linearer Gradient. An der Gelkuppe betrug die Polyacrylamidkonzentration ca. 1,2 %, am anderen Ende 40 %. Dieser Punkt hoher Gelkonzentration stellte sich im Micro-Cap gut dar.

Vor Gebrauch mußten die Gele 10 Stunden bei Zimmertemperatur oder ca. 1 Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer äquilibrieren. In 1 : 8 verdünnter Lösung B konnten sie im Kühlschrank zwischen 0 °C und 4 °C einige Wochen aufbewahrt werden.

3.8.3. Elektrophoresetechnik

Elektrophoresesystem für Gradientengele

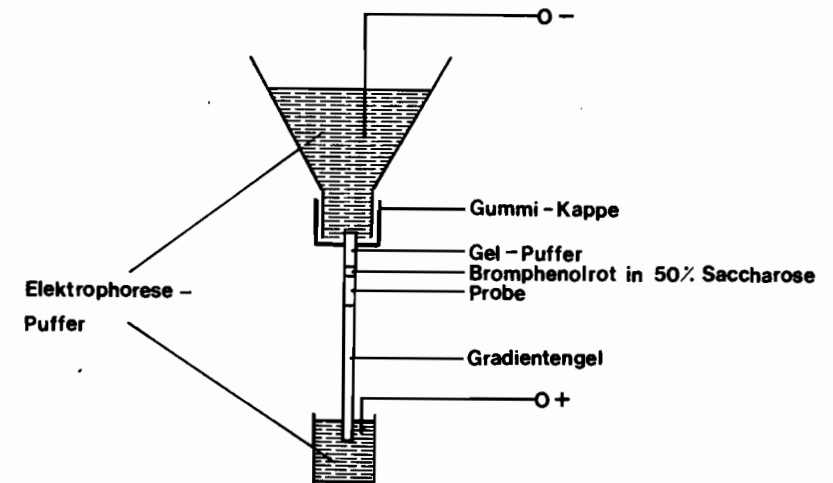


Abb. 6

Vor Durchführung der Elektrophorese wurde die Flüssigkeit über dem Gel abgesaugt und die zu untersuchende Probe aufgetragen.

Um reproduzierbare Mengen der Probe aufzutragen, wurden die jeweils nötigen Auftragsstrecken an den Micro-Caps ausgemessen und markiert. Direkt auf die Probe wurde dann eine 1 mm dicke Schicht Bromphenolrot in 50 %iger SaccaroseLösung pipettiert, die wegen ihres hohen spezifischen Gewichtes nach unten sank und die Probenlösung "beschwerte" und stabilisierte. Beim nächsten Pipettierschritt und den weiteren Arbeitsgängen wurde dadurch eine Phasenvermischung verhindert; alle Manipulationen wurden mit Hilfe eines Zeiss-Stereomikroskopes zur Aufsichtsbetrachtung bei acht- bis zehnfacher Vergrößerung vorgenommen. Als letzter Pipettierschritt folgte das Auftragen von 1 : 8 verdünnter Lösung B bis zum oberen Rand des Micro-Caps.

Der anschließende Elektrophoreselauf erfolgte wie in der oben beschriebenen Mikro-Disk-Technik nach dem von ALLEN (2) beschriebenen Elektrophoresesystem (Abb. 6). Die zusätzliche Verwendung eines "stacking gels" lieferte keine bessere Trennung, wie eigene Vorversuche zeigten.

Während der Elektrophorese erfolgte zuerst eine Vorfraktionierung der Proteine im Gradientengel. Sie dauerte so lange, bis die Glycinfront durch die Schicht der 1 : 8 verdünnten Lösung B gewandert ist. Dann erfolgte die Konzentrierung, die infolge der Zugabe von Bromphenolrot deutlich zu verfolgen ist. Auch wenn die Probenlösung in einer Länge bis zu 4 cm aufgetragen werden mußte, war die Konzentrierung auf Bruchteile eines Millimeters gegeben. Es bildete sich ein scharfer, durch Bromphenolrot gefärbter Disk. Dahinter wurden die Proteine konzentriert, die allerdings wegen des Fehlens von Bromphenolblau unsichtbar waren.

Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Pufferfront 1 mm oberhalb der konzentriertesten Stelle des Geles stand. In der Literatur wird beschrieben, daß die Beendigung der Elektrophorese nach Durchlaufen der Pufferfront oder noch später erfolgen soll. Das ist zweckmäßig z.B. bei der Trennung von Blutsärumproteinen. Weil im Spermaplasma aber einige sehr schnell wandernde Banden vorhanden sind, die dabei verloren gehen würden, wurde die Elektrophorese früher gestoppt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beim Gradientengel hing vom rich-

tigen Zeitpunkt der Beendigung des Elektrophoreselaufes ab, so daß Zeit und Spannung variabel waren. Während der Vorfraktionierung und Isotachyphorese wurde eine Spannung von 80 Volt eingestellt. Auch bei längerer Isotachyphorese war keine Bandenunschärfe infolge Diffusionserscheinungen zu befürchten. Nach der Theorie von KOHLRAUSCH (57) wandern die Proteinionen als scharf begrenzte Scheiben, geordnet nach ihrer Beweglichkeit. Sie werden nur infolge der Vorfraktionierung etwas weiter voneinander getrennt als im System nach ORNSTEIN (96) und DAVIS (10). Erst dann, wenn die Glycinfront die Proteine überwandert hat, erfolgt durch Diffusion eine Verbreiterung der Banden. Eine höhere Spannung in der ersten Phase würde trotz der Saccharosezugabe zu Farbstoff und Probe zu einer unerwünschten Bildung von Strömungen und zur Phasenvermischung führen (z.B. durch Wärmestau im Inneren der Micro-Caps). Nach Beendigung der Konzentrierung, also dann, wenn das Bromphenolrot als scharfer Disk im Trenngel erschien, konnte die Spannung auf ca. 160 Volt erhöht werden. Die eigentliche Trennung lief dann innerhalb von knapp 10 Minuten ab und ergab ein sehr scharfes Bandenmuster.

Wurde zur Elektrophorese sehr verdünnte Proteinlösung verwendet, die das Aufsetzen eines zweiten Micro-Caps erforderlich machte, wurde dieses entfernt, wenn die Farbstoff-Front in das Trenngel gewandert war. Die aufgestockte Kapillare enthielt zu diesem Zeitpunkt als negatives Ion hauptsächlich das schlecht bewegliche "trailing ion" Glycin, welches eine geringe elektrische Leitfähigkeit bzw. einen hohen elektrischen Widerstand hat. Auch bei hoher Spannung würde daher nur ein geringer Strom fließen, die Elektrophoresezeit wäre weit länger und die Trennung unschärfer.

Maximal konnte die Elektrophoresespannung so hoch gewählt werden, daß sich ein Strom von ca. 80 μ A einstellte. Wurde dieser Strom nicht überschritten, so trat infolge des günstigen Verhältnisses zwischen Umfang der Kapillare und ihrer Querschnittsfläche kein Wärmestau durch die freiwerdende Energie ($N = RI^2$) auf.

Das Ausstoßen der Gele aus den Kapillaren wurde durch einen Stahldraht ermöglicht, wobei vom hochkonzentrierten Ende her

das Gel ausgedrückt wurde. Färbung und Differenzierung entsprechen den bereits unter 3.7.4. beschriebenen Verhältnissen.

Für die Mikro-Disk-Elektrophorese am Gradientengel durften nur sorgfältig gereinigte Glaskapillaren verwendet werden. Die Polyacrylamidkonzentrationsgradienten hingen von den Strömungsverhältnissen in den Micro-Caps ab und jede Unreinheit würde die Kapillarkräfte ändern. Dadurch könnte die Füllung der Micro-Caps nicht durch laminare Strömung erfolgen. Es entstünden Turbulenzen, so daß die Qualität der Gradientengele schlecht und eine gleichmäßige Auftrennung der einzelnen Proteinbanden unmöglich wäre.

Auf die Verwendung von Triton X - 100 kann bei Gradientengelen verzichtet werden. Doch erleichtert das Detergens das Austreiben der Gele mit dem Draht. Ein weiterer Vorteil von Triton X - 100 war, daß es die Benetzung der Gele während der Fixation und Färbung verbesserte. Ohne Zusatz von Detergens schwimmen die Gele oft auf der Oberfläche der Färbelösung und werden nur schlecht benetzt. Allerdings würde Triton X - 100 bei der SDS-Elektrophorese stören.

3.9. Isoelektrische Fokussierung

Stammlösungen:

Stammlösung P 4 g Acrylamid 0,1 g Bisacrylamid H ₂ O ad 7,5 ml	Stammlösung Q 0,063 ml TEMED H ₂ O ad 10 ml
Stammlösung R 60 %ige Saccharoselösung	Stammlösung S 40 %ige Ampholine pH 3 - 10
Stammlösung T 10 mg Ammoniumperoxydisulfat H ₂ O ad 10 ml	Stammlösung U 4 % Ampholine pH 3 - 10 in 12 %iger Saccharoselösung

Zugabe von Triton X - 100 war nicht nötig, da sich die Gele durch Wasserdruck leicht aus den Micro-Caps entfernen ließen.

Polymerisationsgemisch:	Stammlösung P	0,25 ml
	Stammlösung Q	0,25 ml
	Stammlösung R	0,40 ml
	Stammlösung S	0,20 ml
	Stammlösung T	1,00 ml

Die Micro-Caps wurden zu drei Viertel mit dem Polymerisationsgemisch gefüllt, der Rest wurde mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das überstehende Wasser entfernt. 0,6 µl Probenlösung wurden aufgetragen und der restliche Raum der Micro-Caps mit Lösung U gefüllt. Die Elektrophoresezeit betrug ca. 50 Minuten bei einer angelegten Spannung von 200 Volt. Die Proteine wanderten von der Anode nach unten zur Kathode. Der Stromfluß sollte gegen Ende der Elektrophorese auf 5 µA gesunken sein. Die Ampholine wurde durch Trichloressigsäure-Fixierung und Waschen entfernt, gefärbt wurde mit Coomassie Brilliant Blau R 250.

In einem anderen System nach Bispink (5) wurde auf ein Polyacrylamidgel mit der Konzentration T = 6,5 % und der Vernetzung C = 2 % die Probe pipettiert, der 50 %ige Glycerin zugegemischt war. Aufgefüllt wurde das Micro-Cap mit 25 %igem Glycerin. Diese Anordnung verhinderte eine Phasenvermischung und bewirkte, daß die Proteine direkt oberhalb des Geles lagen und nicht mit der Elektrodenflüssigkeit in Berührung kamen.

Bei beiden Systemen wurde als Elektrodenflüssigkeit an der Anode verdünnte Schwefelsäure, pH 2,95 und an der Kathode verdünnte Natronlauge, pH 10,4 verwendet.

3.10. Gelatinolyse

In die 20 %igen Polyacrylamid-Trenngele wurde 0,1 % Gelatine einpolymerisiert (GARNER et al., 29, SCHLEUNING et al. 141). Nach der Elektrophorese der Proteine erfolgte eine Inkubation in Pufferlösung von pH 7,5, danach die Färbung der Gelatine mit einem Gemisch von

0,2 % Ponceau S
0,1 % Amidoschwarz 10 B
0,2 % Lichtgrün
in 5 %iger Trichloressigsäure

In einem weiteren Versuchsansatz wurden nach vorausgegangener Elektrophorese die Gele in einer feuchten Kammer auf den Fotoplatten nach WENDT et al. (163, 164) inkubiert. Die Gele wurden dazu entweder in feine Scheiben geschnitten, die der Reihe nach einzeln auf die Gelatine-Fotoplatten gelegt wurden, oder in ganzer Länge aufgelegt.

Die Polyacrylamidgele, in die Gelatine einpolymerisiert war, ließen sich außerordentlich schwer aus den Micro-Caps entfernen. Es gelang nur bei Gradientengelen mit Hilfe eines passenden Stahldrahtes.

3.11. Berechnungsgrundlagen für die durchgeführten Korrelationen

Die bei den folgenden Berechnungen benutzten Zeichen sind:

- Rf Rf-Wert ≙ Beweglichkeit der Proteine
- log Y₀ Abschnitt der Korrelationsgeraden auf der y-Achse im Ferguson-plot ≙ b der allgemeinen Geradengleichung
- Y₀ ≙ A, B, C... der einzelnen Proteine
- K_R "retardation coefficient" bei Verwendung natürlicher Logarithmen ≙ Steigung der Korrelationsgeraden im Ferguson-plot
- T Gelkonzentration in %
- r Korrelationskoeffizient
- z Wert des Korrelationskoeffizienten nach z-Transformation
- p Fehlerwahrscheinlichkeit
- r₀ bzw. z₀ bedeuten, daß keine Korrelation vorhanden ist.

Die allgemeine Form der Geradengleichung ist: y = b - mx.

FERGUSON (26) führte 1964 folgende Beziehung ein (Ferguson-plot):

$$\lg Rf = \lg Y_0 - K_R T.$$

Sie läßt sich wie folgt umwandeln:

$$\lg Rf = \lg Y_0 + \lg 10^{-K_R T}$$

wegen: $K_R T = K_R T \lg 10 = \lg 10^{K_R T}.$

Nach Delogarithmieren entsteht:

$$Rf = Y_0 10^{-K_R T}.$$

Ersetzt man den dekadischen durch den natürlichen Logarithmus, so wird daraus:

$$Rf = Y_0 e^{-\alpha T}.$$

Dabei entspricht alpha dem "retardation coefficient" der einzelnen Proteinspezies. Die Y₀-Werte der einzelnen Proteine werden auch als A, B, C bezeichnet.

Unter Verwendung natürlicher Logarithmen lautet der Ferguson-plot dann:

$$\ln Rf = \ln Y_0 - \alpha T.$$

Korreliert wurde die Gelkonzentration T auf der Abszisse mit dem natürlichen Logarithmus des Rf-Wertes des jeweiligen Proteins auf der Ordinate.

Der Prüfquotient für die Testung des Korrelationskoeffizienten r gegen den Korrelationskoeffizienten r₀ = 0 war bei n = 4 Wertepaaren mit z numerisch identisch:

$$\frac{z - z_0}{s_z} = z \quad \text{wegen } s_z^2 = \frac{1}{n-3} = 1 \quad \text{bei } n = 4.$$

und wegen z₀ = 0 bei r₀ = 0.

Wurden je zwei Ferguson-plots zueinander in Beziehung gesetzt, so errechnete sich durch Gleichsetzen ihr Schnittpunkt (T_μ; lnRf_μ).

Er gab die Gelkonzentration T = T_μ an, bei der keine Trennung der beiden entsprechenden Proteine erfolgte. Auf der Ordinate ergab sich der dazugehörige Rf-Wert Rf_μ. Weiter wurde dann die Geradengleichung der Winkelhalbierenden der Korrelationsgeraden berechnet. Ihre Steigung ergab sich durch folgende Formel:

$$m_w = \tan \frac{(\text{arc tan } m_a + \text{arc tan } m_b)}{2}.$$

Auch m_w war negativ.

Der Y-Abschnitt wurde errechnet durch Einsetzen des gemeinsamen bekannten Schnittpunktes (T_μ; lnRf_μ) in die allgemeine Geradengleichung.

RODBARD, CHRAMBACH und WEISS (112) zeigten, daß bei einer Reduktion der Durchschnittsgeschwindigkeit um $1/e$ ($e = 2,718$) eine maximale Trennung auftritt. Rf_{μ} wurde durch den Wert e dividiert und durch Einsetzen in die Gleichung der Winkelhalbierenden der dazugehörige x -Wert T_{max} berechnet. T_{max} gab die Gelkonzentration an, bei deren Anwendung eine maximale Entfernung der fraglichen Proteinbanden voneinander nach der Elektrophorese gegeben war. Eine optimale Trennung unter Einbeziehung einerseits der Entfernung der Banden voneinander, andererseits der Diffusionsunschärfe war nach RODBARD et al. (112) bei einer Gelkonzentration T_{opt} gegeben, die sich wie folgt errechnete:

Aus den bekannten Größen T_{μ} und T_{max} ergab sich ΔT :

$$\Delta T = T_{max} - T_{\mu}$$

T_{opt} war dann:

$$T_{opt} = T_{\mu} + 2 \Delta T = 2 T_{max} - T_{\mu}$$

Um in der Praxis T_{μ} , T_{max} und T_{opt} schneller zu berechnen, wurde folgende Methode (RODBARD et al. 112) verwendet:

Wie oben abgeleitet, läßt sich der Ferguson-plot unter Benutzung natürlicher Logarithmen folgendermaßen ausdrücken:

$$Rf_A = A e^{-\alpha T} \quad \text{mit } \alpha = \ln 10 (K_R)_A,$$

und $Rf_A = \text{Rf-Wert (Beweglichkeit) des Proteins A.}$

Daraus wird durch Logarithmieren:

$$\ln Rf_A = \ln A - \alpha T.$$

Dabei entspricht α der Steigung m und A entspricht $e^b = Y_0$.

T_{μ} und T_{max} errechnen sich dann aus folgenden Formeln:

$$T_{\mu} = \frac{\ln \frac{A}{B}}{\alpha - \beta} \quad \text{und} \quad T_{max} = \frac{\ln \left(\frac{A\alpha}{B\beta} \right)}{\alpha - \beta}$$

$A, B \dots \hat{=} Y_0$ der Proteine

$\alpha, \beta \dots \hat{=} m$ der Proteine jeweils mit $\alpha \neq \beta$

4. E R G E B N I S S E

=====

4.1. Bestimmung der optimalen Gelkonzentration

4.1.1. Der Weg zur Gradientengel-Elektrophorese

HEDRICK und SMITH (34) korrelierten Rf -Werte von Proteinen nach der Elektrophorese an Polyacrylamidgelen mit den dabei verwendeten Gelkonzentrationen T . Da die Korrelation umgekehrt exponentiell verlief, ließ sie sich durch semilogarithmisches Auftragen auf eine Gerade mit negativer Steigung zurückführen.

Abb. 7 zeigt die Densitogramme von Elektrophoresen von Blutserum am Polyacrylamidgel bei unterschiedlichen Gelkonzentrationen. Die gemessenen Wanderungsstrecken w der einzelnen Proteinbanden, die Wanderungsstrecken der Pufferfronten w_p , die berechneten Rf -Werte und deren natürlicher Logarithmus $\ln Rf$ in Abhängigkeit von den verwendeten Gelkonzentrationen T sind in Tab. 1 aufgeführt. In Tab. 2 sind die Ergebnisse der Korrelation der $\ln Rf$ - Werte mit den Gelkonzentrationen T dargestellt.

Je zwei Proteine wurden in Beziehung zueinander gesetzt und die zugehörigen Werte T_{μ} , T_{max} und T_{opt} errechnet (s.o. 3.11.). Die Ergebnisse, sowie Anmerkungen über das beobachtete Trennverhalten sind in Tab. 3 angegeben.

Für die Proteinpaare 2-3 und 2-4 ließ sich die optimale Trennkonzentration T_{opt} berechnen. Sie betrug 39,5 % bzw. 27 %.

Blutserum ist in seiner Zusammensetzung besser erforscht als Spermaplasma. Daher wurden die elektrophoretischen Trennungen und Korrelationsrechnungen zuerst am Beispiel des Blutserums durchgeführt.

Die gleichen Untersuchungen wurden dann auch am Spermaplasma vorgenommen. Bei vier Proteinen wurde die Gelkonzentration T mit dem natürlichen Logarithmus des Rf -Wertes des jeweiligen Proteins korreliert.

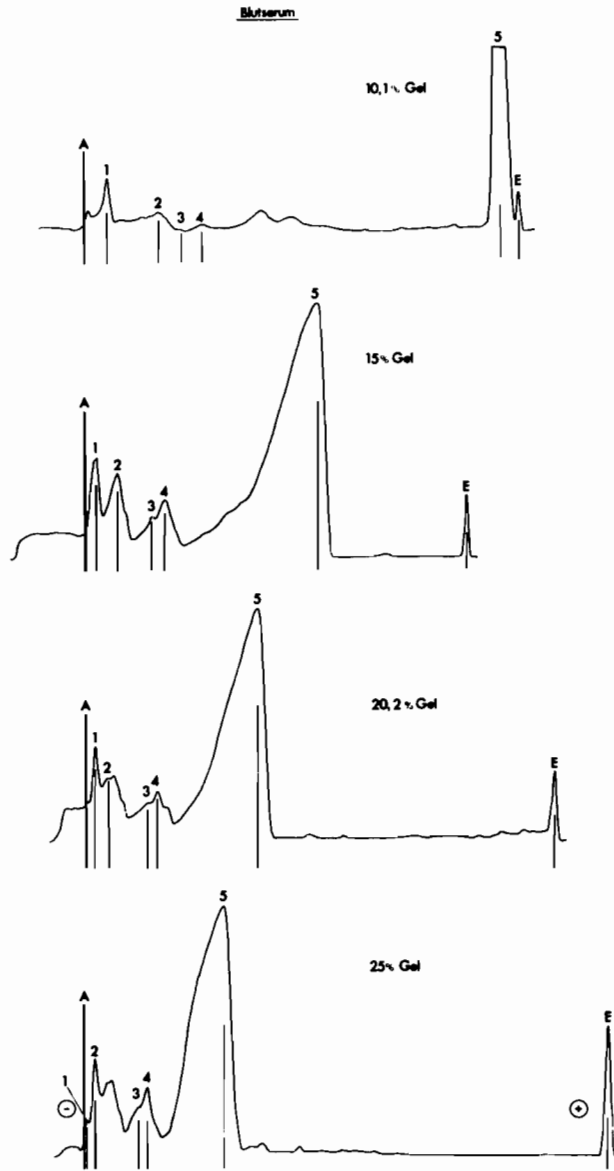


Abb. 7: Elektrophorese von Blutserum am Polyacrylamidgel bei verschiedenen Gelkonzentrationen
 A: Anfang, E: Ende der Trennstrecke (Pufferfront);
 1 - 5: Proteine, deren Rf-Werte mit T korreliert werden

Tab. 1: Wertetabellen für die Mikro-Disk-Elektrophorese von Blutserum (obere Tab.) und Spermaplasma (untere Tab.) am Polyacrylamidgel mit homogener Gelkonzentration T (Abb. 7, 8):

Prot.	10,1%T			15,0%T			20,2%T			25,0%T		
	w	Rf	ln Rf	w	Rf	ln Rf	w	Rf	ln Rf	w	Rf	ln Rf
1)	01,30	0,058	-2,847	00,62	0,0310	-3,474	00,45	0,0180	-4,017	0,19	0,0070	-4,962
" 2)	03,90	0,172	-1,760	01,70	0,0850	-2,465	01,20	0,0490	-3,016	0,55	0,0200	-3,912
" 3)	05,05	0,222	-1,505	03,40	0,1710	-1,766	03,25	0,1330	-2,017	2,90	0,1060	-2,244
" 4)	06,20	0,273	-1,298	04,15	0,2090	-1,565	02,85	0,1570	-1,852	3,30	0,1210	-2,112
" 5)	21,90	0,965	-0,036	12,20	0,6130	-0,489	09,05	0,3690	-0,997	7,30	0,2670	-1,321
Pufferfront w _p		22,7			19,9			24,5			27,3	
Prot. 1)	15,13	0,655	-0,423	08,47	0,4248	-0,856	05,75	0,2934	-1,226	3,70	0,1820	-1,704
" 2)	17,40	0,7516	-0,286	10,30	0,5165	-0,662	06,68	0,3408	-1,076	4,75	0,2340	-1,452
" 3)	21,10	0,9134	-0,091	11,80	0,5918	-0,525	09,23	0,4709	-0,753	6,35	0,3130	-1,162
" 4)	21,74	0,941	-0,061	13,60	0,6820	-0,383	10,10	0,5153	-0,663	7,22	0,3557	-1,034
Pufferfront w _p		23,10			19,94			19,60			20,30	

Die Proteine sind mit 1) bis 5) bzw. 1) bis 4) bezeichnet, w ist jeweils die Wanderungsstrecke der Banden in cm. Der Quotient aus Wanderungsstrecke w und Wanderungsstrecke der Pufferfront w_p ergibt den Rf-Wert. Jeweils in der dritten Spalte ist vom Rf-Wert der natürliche Logarithmus angegeben. Korreliert wird die Gelkonzentration T mit dem ln des Rf-Wertes des jeweiligen Proteins.

Tab. 2: Ergebnis der Korrelationsrechnung für Blutserum

Prot.	$b = \ln Y_0$	$\frac{e^b = Y_0}{\Delta A, B \dots}$	$m = a, \beta, y$	s_y	r	z	p
1)	-1,4034	0,2458	-0,1378	0,8960	-0,991	-2,700	0,004
2)	-0,3244	0,7229	-0,1402	0,9085	-0,994	-2,903	0,002
3)	-1,0254	0,3586	-0,0489	0,3189	-0,988	-2,555	0,006
4)	-0,7463	0,4741	-0,0547	0,3521	-1,000	$-\infty$	0,000
5)	0,8271	2,2866	-0,0875	0,5652	-0,997	-3,250	0,0006

s_x (Standardabweichung der x-Werte) = 6,443

s_y (Standardabweichung der y-Werte) ist in Spalte 5 angegeben

Tab. 3: Berechnung von T_μ , T_{max} und T_{opt} von je zwei Proteinen des Blutserums

Prot.	T_μ	T_{max}	T_{opt}	Trennverhalten
1-2	-04,25%	-	-	synergistische Trennung
1-3	-04,25%	-	-	synergistische Trennung
1-4	-07,90%	-	-	synergistische Trennung
1-5	-44,30%	-	-	synergistische Trennung
2-3	07,68%	18,28%	39,47%	optimale Konzentration T
2-4	04,90%	15,90%	27,00%	optimale Konzentration T
2-5	-21,90%	-	-	synergistische Trennung
3-4	48,10%	67,30%	105,6%	$T_{opt} = 0$ % Gelkonzentration
3-5	48,00%	63,10%	78,1%	$T_{opt} = 0$ % Gelkonzentration
4-5	48,00%	62,30%	90,9%	$T_{opt} = 0$ % Gelkonzentration

Abb. 8 zeigt die Elektrophoresedensitogramme und Tab. 1 im unteren Teil die Wanderungsstrecken w der einzelnen Proteinbanden, die Wanderungsstrecken der Pufferfront w_p , die berechneten Rf-Werte und deren natürlichen Logarithmus $\ln Rf$ in Abhängigkeit von den verwendeten Gelkonzentrationen T. Die Ergebnisse der Korrelation der $\ln Rf$ - Werte mit den zugehörigen Gelkonzentrationen T sind in Tab. 4 aufgeführt. Der Prüfquotient für die Testung des Korrelationskoeffizienten r gegen den Korrelationskoeffizienten $r_0 = 0$ war bei $n = 4$ Wertepaaren mit z numerisch identisch (s.o.).

Spermplasma

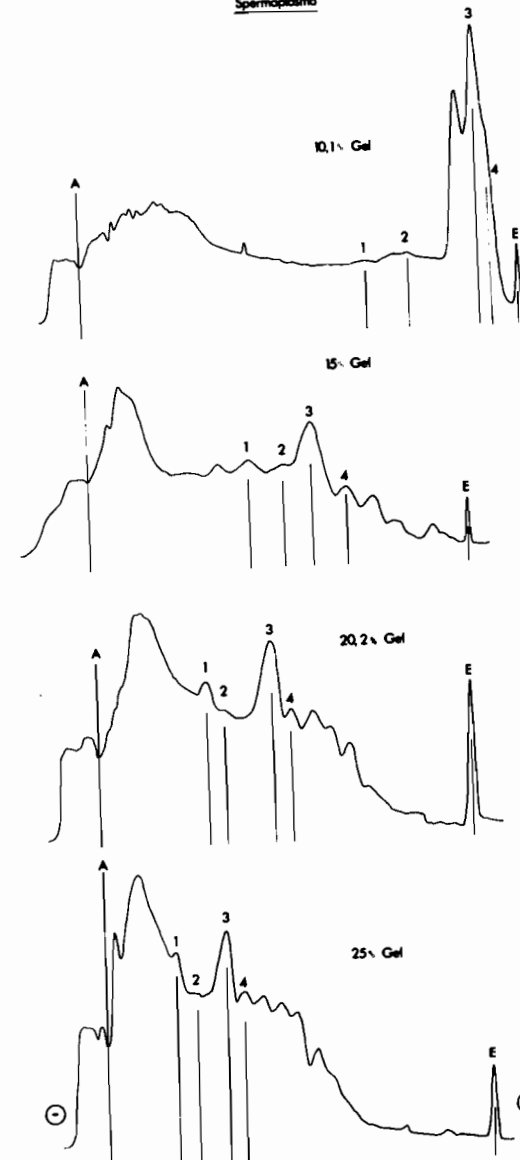


Abb. 8: Elektrophorese von Spermplasma am Polyacrylamidgel bei verschiedenen Gelkonzentrationen
A: Anfang, E: Ende der Trennstrecke; 1-4: Proteine, deren Rf-Werte mit T korreliert werden

Auch hier wurden je zwei dieser Proteine zueinander in Beziehung gesetzt und die zugehörigen Werte T_{μ} , T_{\max} und T_{opt} errechnet (Tab. 5, Rechnungsgang siehe 3.1.).

Tab. 4: Ergebnis der Korrelationsrechnung für Spermaplasma

Prot.	$b = \ln Y_0 \frac{e^b = Y}{A, B, \dots}$	$m = \alpha, \beta, \gamma$	s_y	r	z	p
1)	0,4298	1,537	-0,0843	0,5444	-0,998	-3,453 0,0004
2)	0,5107	1,667	-0,0785	0,5057	-1,000	-∞ 0,0000
3)	0,5780	1,782	-0,0689	0,4471	-0,993	-2,826 0,0030
4)	0,5910	1,806	-0,0641	0,4136	-0,999	-3,800 0,0001

s_x (Standardabweichung der x-Werte) = 6,443
 s_y (Standardabweichung der y-Werte) ist in Spalte 5 angegeben
 r Korrelationskoeffizient
 z Wert des Korrelationskoeffizienten nach z-Transformation
 p Fehlerwahrscheinlichkeit

Tab. 5: Berechnung von T_{μ} , T_{\max} und T_{opt} von je zwei Proteinen des Spermaplasmas

Prot.	T_{μ}	T_{\max}	T_{opt}	Trennverhalten
1-2	-14,0 %	-	-	synergistische Trennung
1-3	-09,6 %	-	-	synergistische Trennung
1-4	-08,0 %	-	-	synergistische Trennung
2-3	-07,0 %	-	-	synergistische Trennung
2-4	-05,6 %	-	-	synergistische Trennung
3-4	-02,7 %	-	-	synergistische Trennung

Da T_{μ} bei diesen vier Proteinen jeweils im negativen Bereich lag, war die erzielte Trennung umso besser, je höher die gewählte Gelkonzentration T lag. Die Trennung erfolgte dann synergistisch auf Grund der Unterschiede in Ladung und Molekülgröße. Bei den untersuchten Spermaplasmaproteinen lag also der Fall b) nach ROBBARD et al. (112) vor: T_{μ} kleiner als 0 - Synergistische Trennung.

Das Polyacrylamidgradientengel mit seiner hohen Gelkonzentration bis zu $T = 40\%$ war daher für die Trennung von Spermplasmaproteinen besonders gut geeignet. Bei den meisten der auftretenden Proteine war beim Gradientengel mit einem "dead run" zu rechnen (RÜCHEL, 117).

In den hier dargestellten Untersuchungen wurde deshalb bevorzugt die Gradientengel-Elektrophorese verwendet.

Da aber im Spermaplasma auch zahlreiche niedermolekulare Proteine enthalten waren, mußte die Elektrophorese gestoppt werden, bevor die Pufferfront das Gel durchwandert hatte. Die niedermolekularen Proteine würden sonst, wie Vorversuche ergaben, verloren gehen.

4.1.2. Isoelektrische Fokussierung im Mikromaßstab

Die Gradientengel-Elektrophorese trennt hauptsächlich auf Grund von Molekulargewichtsunterschieden, da die Proteine auf der Trennstrecke in Bereiche hoher Gelkonzentrationen gelangen. Dagegen kann mit der Technik des Isoelektrischen Fokussierens eine Trennung ausschließlich auf Grund von Ladungsunterschieden vorgenommen werden. Da andere Autoren im Makromaßstab ausgezeichnete Ergebnisse mit Isoelektrischer Fokussierung erzielt hatten (LAVON und BOURSNEILL, 60, LAVON et al. 62, 63), wurde die von NEUHOFF (83) und BISPINK (5) angegebene Technik der Isoelektrischen Fokussierung im Mikromaßstab angewendet.

Die Trennkapazität der Systeme nach NEUHOFF (83) und BISPINK (5) reichte jedoch nicht für die Trennung von Spermplasmaproteinen aus. Des weiteren konnte ein Einwandern der Proteine in den kapillären Spalt zwischen Gel und Glasinnenwand nicht verhindert werden. Außerdem konnte die Ampholine in der angegebenen Konzentration offenbar nicht die Menge Protein aufnehmen, die zur sichtbaren Darstellung einer Bande durch Proteinfärbung erforderlich ist. Die Systeme nach NEUHOFF (96) und BISPINK (5) verwenden zur Färbung ein enzymatisches System, bei dem die Farbe direkt im Gelinneren entsteht. Ein Teil der Gele rutschte während der Fokussierung aus den Micro-Caps heraus, der größte Teil

wies nach der Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R 250 auf der Außenseite schlierenförmige Verunreinigungen auf. Ferner beobachteten wir bei Verwendung des Systems nach Neuhoff, welches Schwefelsäure im Elektrodenpuffer der Anode enthielt, teilweise eine Denaturierung von Proteinen. Das System nach BISPINK (5), das sich gut für die Trennung der LDH-Isoenzyme eignet, brachte ebenfalls keine verwertbaren Ergebnisse bei der Trennung von Spermaplasmaproteinen. Nach unseren Erfahrungen reicht die Kapazität der Isoelektrischen Fokussierung im Mikromaßstab nicht für die Spermaplasmaproteintrennung aus.

4.2. Gradientengel-Elektrophorese

4.2.1. Albumin

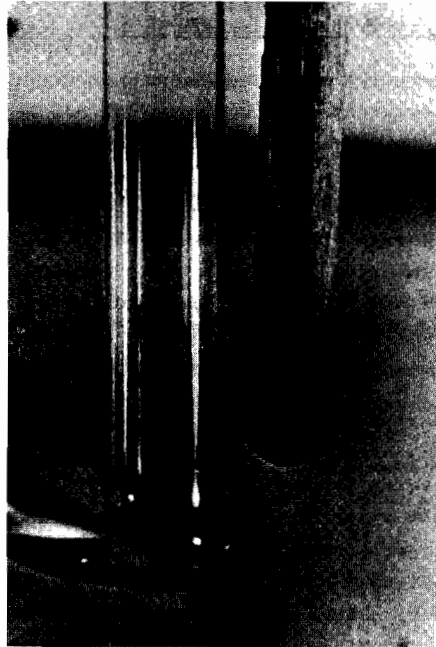


Abb. 9: Hochgereinigtes Humanalbumin nach Gradientengel-Elektrophorese. Größenvergleich mit einem Haushalts-Streichholz

Abb. 9 zeigt als Beispiel einer Gradientengel-Elektrophorese die Trennung von hochgereinigtem Humanalbumin. Um die Dimensionen aufzuzeigen, wurde das Polyacrylamidgel mit einem Haushalts-Streichholz verglichen. Das Polyacrylamidgel, das die verschiedenen Albuminpolymeren (Monomer bis Pentamer) aufweist, wird in 7,5 %iger Essigsäure schwimmend in einem Glasröhrchen aus AR-Glas aufbewahrt.

4.2.2. Blutserum

Am Beispiel von Blutserum (Behringwerke, Standard-Humanserum, Batch Nr. 9756) ließ sich die Trennschärfe der Mikro-Disk-Gradientengel-Elektrophorese zeigen (Abb. 10). 29 Banden sind densitometrisch dargestellt. Die Proteine wanderten von minus nach plus, also von links nach rechts. Links befinden sich die hochmolekularen, rechts die niedermolekularen Proteine.

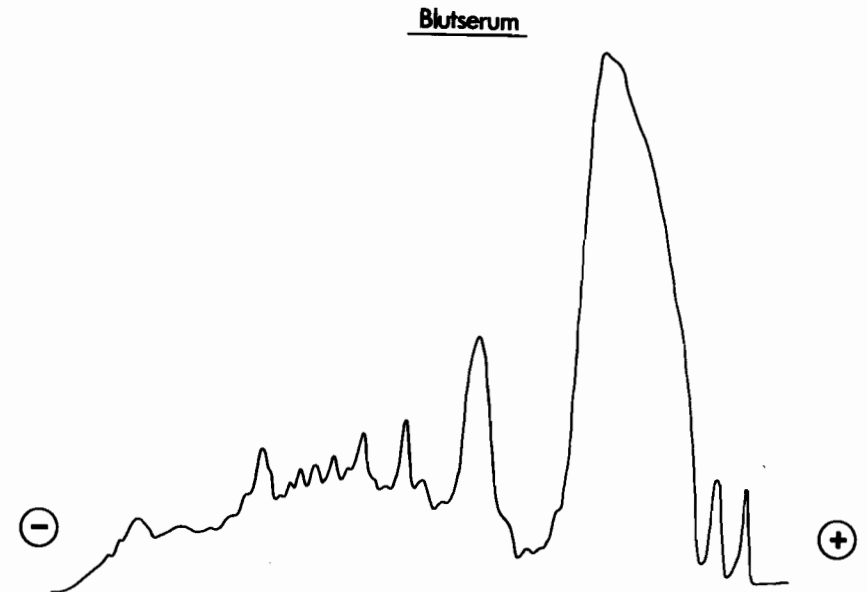


Abb. 10: Gradientengel-Elektrophorese von Blutserum

4.2.3. Spermaplasma

Abb. 11 zeigt ein typisches Beispiel für die Gradientengel-Elektrophorese von Spermaplasma. Das Proteinmuster des Spermaplasmas unterscheidet sich von dem des Blutserums sehr stark. Unter anderem fällt das Vorkommen von weit mehr niedermolekularen Proteinen als im Blutserum auf. Die Albuminbande ist durch A markiert. Rechts davon sollte sich auf Grund des niedrigeren Molekulargewichtes die Bande des Semins, links davon die des Lactoferrin mit höherem Molekulargewicht befinden.

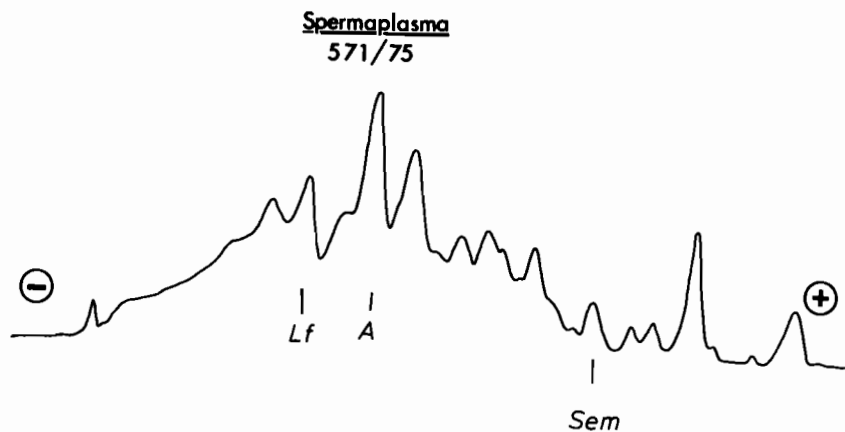


Abb. 11: Gradientengel-Elektrophorese von Spermaplasma
A: Albuminbande; Sem: hypothetische Seminbande;
Lf: hypothetische Lactoferrinbande

4.3. Identifikation einzelner Proteinbanden

4.3.1. Zumischung am Spermaplasma

Die Identifikation einzelner Proteinfractionen nach Polyacrylamidgelelektrophorese im Mikromaßstab kann durch die Charakterisierung der Wanderungsstrecke (Rf-Wert), durch die Zumischung von definierten Proteinen, durch Nachweis der Enzymaktivität

oder immunologisch erfolgen. Als Beispiel wurde zur Identifizierung der Albuminbande hochgereinigtes Humanalbumin in geringer Menge (50 ng) einer Spermaplasmaprobe zugesetzt (Abb. 12). Die bereits vorhandene Bande mit höchster Amplitude zeigt eine weitere Größenzunahme und entspricht somit dem Albuminmonomer. Dahinter, an der Stelle des Pfeiles (A^2) wird eine neue Bande sichtbar, die auf das Albumindimere zurückzuführen ist.

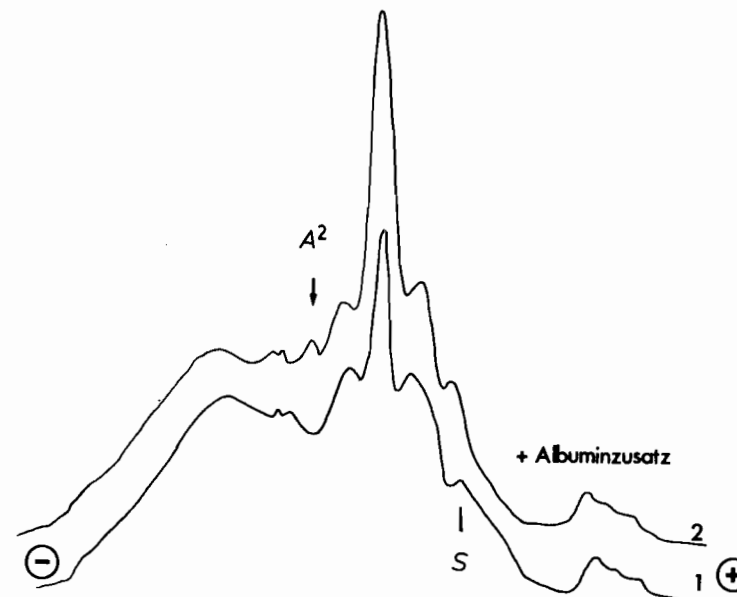


Abb. 12: Spermaplasmaelektrophorese
(1) ohne, (2) mit Albuminzusatz (50 ng)
A-2 (Pfeil) bezeichnet das Albumindimere, S das Semin

Ein weiteres Beispiel für die Identifizierung der Albuminbande zeigt Abb. 13. Nach Zumischung von hochgereinigtem Humanalbumin in unterschiedlichen Konzentrationen nimmt die bereits vorher höchste Bande weiter zu ($A-1$). Die untere Kurve zeigt das Proteinmuster des Spermaplasmas vor Zumischung, die mittlere

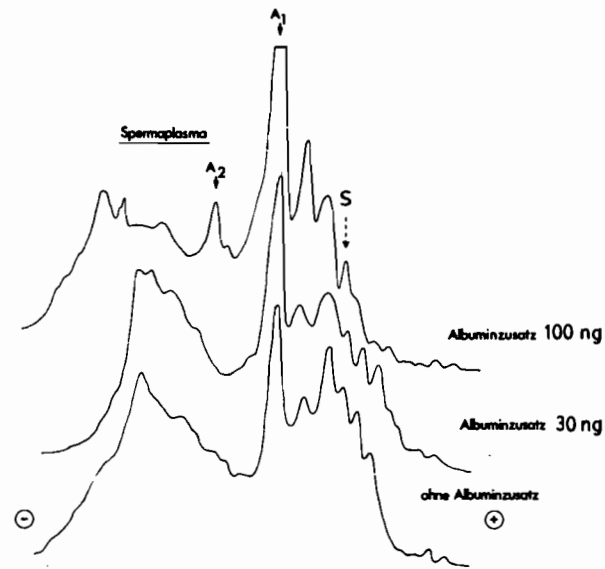


Abb. 13: Spermaplasmaelektrophorese ohne - mit ca. 30 ng - mit ca. 100 ng hochgereinigtem Humanalbuminzusatz
A - 1: Albuminbande, A - 2: Albumindimer, S: Seminin

bei Zumischung von ca. 30 ng und die obere Kurve bei Zumischung von ca. 100 ng Humanalbumin. In dieser obersten Kurve tritt an der Stelle der Pfeilmarkierung (A - 2) ein zusätzlicher Peak auf, der wieder dem Albumindimer entspricht.

Im Spermaplasma ist Lactoferrin in relativ hoher Konzentration vorhanden. Es wird wahrscheinlich in den Bläschendrüsen sezerniert. (TAUBER, 157). Durch Zumischung von Lactoferrin (ca. 10 ng) zu einer Spermaplasmaprobe ließ sich die Lactoferrinbande identifizieren (Abb. 14). Es ist die nächstgrößere Bande links vom Albumin.

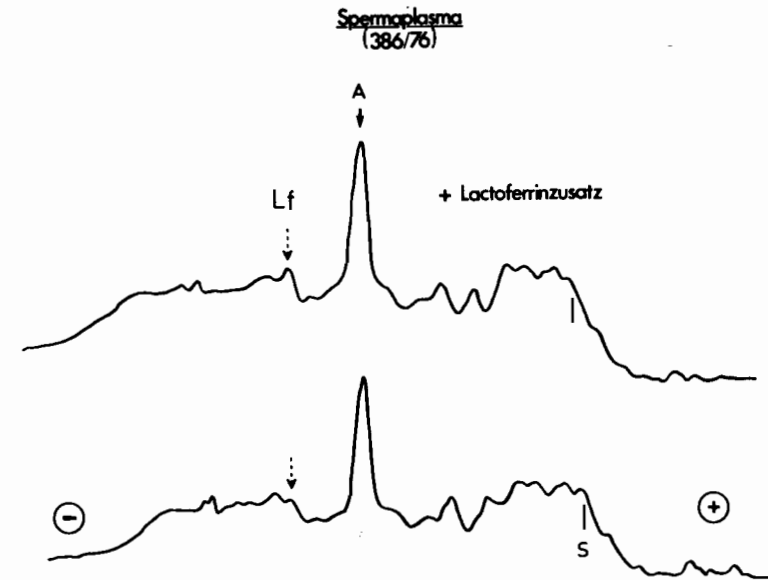


Abb. 14: Spermaplasmaelektrophorese - unten ohne - oben mit Zusatz von ca. 10 ng Lactoferrin
Die identifizierte Lactoferrinbande ist mit einem gestrichelten Pfeil gekennzeichnet (Lf).
S entspricht der hypothetischen Seminbande.

4.3.2. Gelatinolyse

Als weitere Methode zur Bandenidentifikation bietet sich bei Enzymen der Nachweis der Enzymaktivität an. Bei dem proteolytischen Enzym Seminin führte das Nachweisverfahren der Gelatinolyse jedoch nicht zu einem Ergebnis.

Wie bereits in Abschnitt 3.10. beschrieben, konnten nur Gradientengele für das Einpolymerisieren von Gelatine im Mikromaßstab verwendet werden. Nach Elektrophorese bei einem pH-Wert des Trenngeles von 8,8 ließen sich keine Banden mit Gelatine andauernder Aktivität nachweisen. Bei einem Gel-pH-Wert

im Bereich 5 wanderten die Proteine nicht, und bei weiterer Senkung des pH-Wertes besteht bei einem Teil der Proteinasen die Gefahr der Denaturierung. So ist z.B. das Seminin im Gegensatz zum Akrosin nicht säurestabil. Gelatinolytische Effekte ließen sich auch an den Gelatineplatten nach WENDT et al. (163, 164) nicht nachweisen.

4.3.3. Molekulargewichtskorrelation mit Albumin

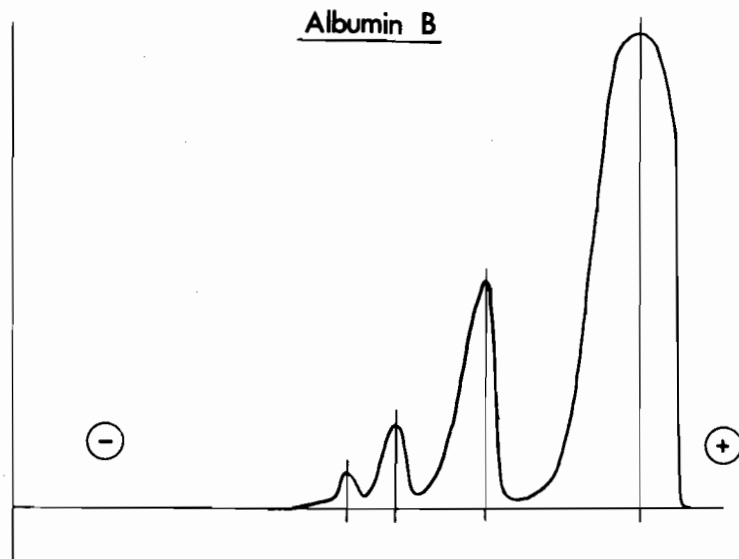


Abb. 15: Gradientengel-Elektrophorese von Rinderalbumin

Zur Identifizierung von Einzelbanden durch Analyse der Wanderungsstrecke eignet sich bei kontinuierlichen Polyacrylamidgelen die Rf-Wertbestimmung. Bei Gradientengelen empfiehlt sich eine von RÜCHEL et al. (117) angegebene Methode. Danach besteht eine umgekehrt exponentielle Funktion zwischen der Wanderungsstrecke im Gradientengel und dem Molekulargewicht wandernder Substanzen. Also ist der Logarithmus des Molekularge-

wichtes eines Proteins umgekehrt abhängig von seiner Wanderungsstrecke.

Zur Messung der Wanderungsstrecken wurde von den Maxima der Mikrodensitometerkurve aus das Lot auf die Basislinie gefällt und der Abstand von irgendeinem Bezugspunkt, z.B. dem linken Papierrand oder der Gelkuppe gemessen.

An zwei Beispielen einer Elektrophorese von Rinderalbumin (Abb. 15 und 16) wurde diese Korrelation zuerst durchgeführt. Die Messungen wurden an den Originalkurven, nicht an den Photographien vorgenommen. Der Korrelationskoeffizient war in beiden Fällen $r = -0,999$.

Tab. 6: Wertetabelle für Rinderalbumin B

	Monomer	Dimer	Trimer	Tetramer
x = relative Wanderungsstrecke	15,670	11,800	09,550	08,340
Molekulargewicht (MG)	68 000	136 000	204 000	272 000
y = ln MG	11,127	11,820	12,226	12,514

Daraus errechnete sich die Korrelationsgerade

$$y = \ln \text{MG} = 14,035 - 0,1863 x.$$

mit Standardabweichung der y-Werte $s_y = 0,601$ und Standardabweichung der x-Werte $s_x = 3,223$

Der Korrelationskoeffizient r in Abb. 15 wurde wie folgt berechnet:

$$r = m \frac{s_x}{s_y} = -0,1863 \cdot 3,2231 : 0,60117 = -0,999.$$

- m: Steigung der Korrelationsgeraden
- s_x : Standardabweichung der x-Werte
- s_y : Standardabweichung der y-Werte

Die z-Transformation in eine Normalverteilung ergab:

$$z = \arctan \text{hyp } r = \arctan \text{hyp } -0,999 = -3,800.$$

Bei Testung gegen die Nullhypothese, daß keine Korrelation vorläge, ergab sich als Prüfquotient bei n = 4 Paaren:

$$\frac{z - z_0}{s_z} = (z - z_0) (n - 3)^{-\frac{1}{2}} = -3,800.$$

Damit lag die Fehlerwahrscheinlichkeit unter 0,0001.

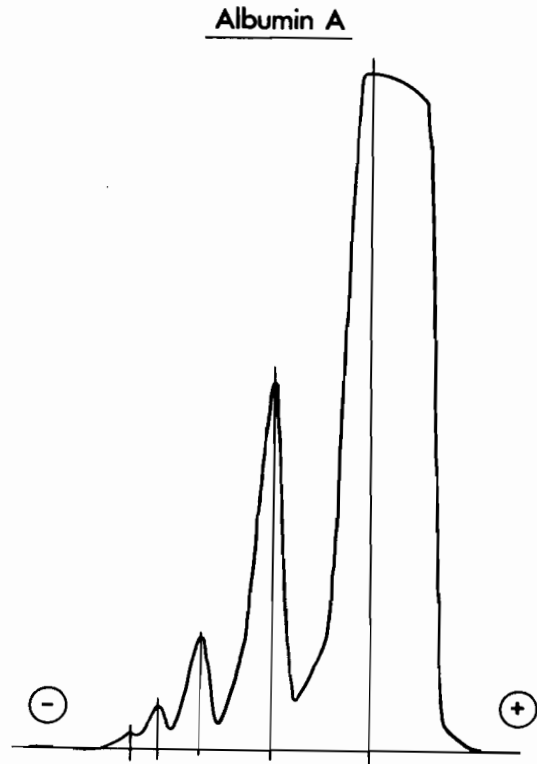


Abb. 16: Gradientengel-Elektrophorese von Rinderalbumin

Bei dem in Abb. 16 gezeigten Elektrophoreselauf wurde mehr Substanz aufgetragen, so daß fünf Banden zu sehen sind.

Tab. 7: Wertetabelle für Rinderalbumin A:

	Monomer	Dimer	Trimer	Tetramer	Pentamer
x = relative Wanderungsstrecke	15,250	12,850	11,100	10,050	09,350
Molekulargewicht (MG)	068 000	136 000	204 000	272 000	340 000
y = ln MG	11,127	11,820	12,226	12,514	12,737

Daraus errechnete sich die Korrelationsgerade

$$y = \ln \text{MG} = 15,2204 - 0,2676 x.$$

mit Standardabweichung der y-Werte $s_y = 0,6355$ und Standardabweichung der x-Werte $s_x = 2,373$

Der Korrelationskoeffizient r in Abb. 16 war dann

$$r = m \frac{s_x}{s_y} = -0,2676 \cdot 2,373 : 0,6355 = -0,999.$$

Die z-Transformation in eine Normalverteilung ergab:

$$z = \text{arc tan hyp } r = \text{arc tan hyp } -0,999 = -3,800$$

Bei Testung gegen die Nullhypothese, daß keine Korrelation vorläge, ergab sich als Prüfquotient bei n = 5 Paaren:

$$\frac{z - z_0}{s_z} = (z - z_0) (n - 3)^{-\frac{1}{2}} = -5,374.$$

Damit lag die Fehlerwahrscheinlichkeit unter 0,000001.

Mit Hilfe der beschriebenen Korrelation läßt sich in relativ einfacher Weise eine Molekulargewichtsbestimmung durchführen. Wenn ein Protein mit unbekanntem Molekulargewicht (MG') zusammen mit verschiedenen Marker-Proteinen, deren Molekulargewichte bekannt sind, am Gradientengel wandert, werden die relativen Wanderungsstrecken bestimmt. Aus den Daten der Marker-Proteine wird eine Regressionsgerade wie oben formuliert berechnet. Das gesuchte Molekulargewicht (MG') ergibt sich dann aus der Wanderungsstrecke x' des Proteins:

$$\ln \text{MG}' = f(x'). \quad \text{MG}' = e^{f(x')}.$$

Der Korrelationsquotient r gibt Auskunft über die Qualität der Gele, d.h. über die Linearität der Konzentrationsgradienten.

4.3.4. Molekulargewichtskorrelation mit Spermaplasma

Albumin ist im Spermaplasma das Protein mit größter Konzentration (BLENK und HOFSTETTER, 6). Es war im oben dargestellten Zumischungsversuch als höchste Bande identifiziert worden und war bei den Spermaplasmaproben praktisch immer eindeutig zu identifizieren.

Auch Lactoferrin, das wahrscheinlich aus den Bläschendrüsen stammt (TAUBER, 157), ist im Spermaplasma in relativ hoher Konzentration vorhanden. Durch Zumischung von Lactoferrin zu Spermaplasmaproben ließ sich die Lactoferrinbande identifizieren. Es war die nächste größere Bande links vom Albumin (Pfeil in Abb. 14). Dieser Peak war allerdings bei verschiedenen Proben sehr unterschiedlich hoch, was der sehr unterschiedlichen Konzentration von Lactoferrin im Spermaplasma entsprechen dürfte. Es war nicht in jeder Spermaplasma-Elektrophorese sicher zu lokalisieren.

In Abb. 11 von Spermaplasma 571/75 ließ sich die Korrelationsgerade (Korrelation der Wanderungstrecken zum Molekulargewicht) berechnen, und es war möglich, eine Schätzung für die Molekulargewichte der übrigen Banden zu geben.

	Wanderungstrecke	ln MG
Lactoferrin	$x_1 = 4,3$	$y_1 = \ln 90\ 000$
Albumin	$x_2 = 5,7$	$y_2 = \ln 69\ 000$

$x_{Sem} = 10,0$ $y = \ln MG = 12,2 - 0,19 x.$

Für Lactoferrin wurde in dieser Berechnung ein Molekulargewicht von 90 000 angenommen. Die Literaturangaben differieren zwischen 75 000 und 95 000.

Für das Seminin, das im Elektrophoresemuster von Spermaplasma identifiziert werden sollte, errechnete sich dann die markierte Bande der Abb. 11.

Für das Spermaplasma von Abb. 14 mit Lactoferrinzumischung ergab die Korrelationsrechnung folgendes Ergebnis:

	Wanderungstrecke	ln MG
Lactoferrin	$x_1 = 8,5$	$y_1 = \ln 90\ 000$
Albumin	$x_2 = 11$	$y_2 = \ln 69\ 000$

$y = \ln MG = 12,3 - 0,11 x.$

$x_{Sem} = 18,1$

Dem Seminin entsprach dann die in Abb. 14 markierte Bande.

Möglich war auch eine Korrelationsberechnung bei Proben mit Albuminzumischung, wenn das Albumindimer erschien, da dessen Molekulargewicht bekannt war. Als Beispiel sei die Albuminzumischung der Abb. 13 (oberste der drei Kurven) angegeben.

	Wanderungstrecke	ln MG
Albumindimer	$x_1 = 5,4$	$y_1 = \ln 138\ 000$
" -monomer	$x_2 = 8,6$	$y_2 = \ln 069\ 000$

$y = \ln MG = 13,0 - 0,217 x.$

$x_{Sem} = 12,4$

Dem Seminin entsprach die mit einem gestrichelten Pfeil markierte Bande der Abb. 13.

Bei einem weiteren Beispiel der Albuminzumischung in Abb. 12 errechneten sich folgende Werte:

	Wanderungstrecke	ln MG
Albumindimer	$x_1 = 8,9$	$y_1 = \ln 138\ 000$
" -monomer	$x_2 = 11,2$	$y_2 = \ln 069\ 000$

$y = \ln MG = 14,45 - 0,295 x.$

$x_{Sem} = 14\ cm.$

Die errechnete Semininbande ist mit S markiert.

Eine Übertragung der Korrelationsgeraden von einem Gel auf andere wurde ebenfalls versucht. Die Korrelationsgerade, die anhand eines Densitogrammes nach Elektrophorese von hochgereinigtem Albumin gewonnen wurde (Korrelation der Wanderungstrecke x eines Albuminoligomeren mit dem Molekulargewicht), wurde zur Molekulargewichtsberechnung an anderen Gradientengelen an-

gewendet. Mit Hilfe der Korrelationsgeraden, die sich als Mittelwert (Winkelhalbierende) der beiden aus Abb. 15 und 16 jeweils errechneten Geraden ergab, errechnete sich tatsächlich in den Densitogrammen der Abb. 9, 12, 13 und 14 die gleiche markierte Bande, die sich für Seminin mit der ursprünglich verwendeten Korrelationsrechnung ergeben hatte.

Die Korrelationsgeradengleichung war:

$$y = \ln MG = 14,63 - 0,181 x.$$

Um sie zu errechnen, wurden die Daten der Wertetabellen für Albumin A und B, die am Original-Densitogramm gewonnen wurden, proportional so umgerechnet, daß die Differenzstrecke zwischen A-1 und A-2 (Albuminmonomer und -dimer) gleich war. Mit der so berechneten Korrelationsgeraden ließen sich dann die Wanderungstrecken verschiedener Proteine mit bekanntem Molekulargewicht am Gradientengel angeben, wie sie unter den gegebenen Standardbedingungen der Elektrophorese auftraten. Folgende Werte ergaben sich für Albumin, Lactoferrin und Seminin:

A-2: 15,5, Lf: 17,78, A-1: 19,33, Sem: 23,85 cm
 Streckendifferenzen: (A-1)-(A-2) = 3,83; (A-1) - Lf = 1,55.

Um eine Bandenidentifizierung an Densitogrammen bzw. deren Photographien durchzuführen, wurden diese Werte proportional auf die Größenverhältnisse des betreffenden Densitogrammes bzw. der Photographie umgerechnet. Betrug in einer Abbildung z.B. die Differenz (A-1) - Lf = 1,5 cm, so wurden alle Wanderungstrecken der Standardgeraden mit 1,5/1,55 multipliziert.

Unter identischen Elektrophoresebedingungen und bei gleichen Konzentrationsgradienten genügt bei dieser Berechnungsmethode zur Bandenidentifikation eine einzelne bekannte Bande, z.B. das Albumin, um einerseits alle weiteren Banden identifizieren zu können, wenn deren Molekulargewicht bekannt ist. Umgekehrt können die Molekulargewichte aus den Wanderungstrecken der Proteinbanden bestimmt werden.

4.3.5. Zumischung am Prostataexprimat

Da das Seminin aus der Prostata stammt (TAUBER, 158), wurde versucht, es im Prostataexprimat ebenfalls nachzuweisen. Durch Prostatamassage gewonnenes Prostatasekret enthält allerdings häufig auch Bläschenkrüsensekret. Ein Beispiel für ein Prostataexprimat zeigt Abb. 17.

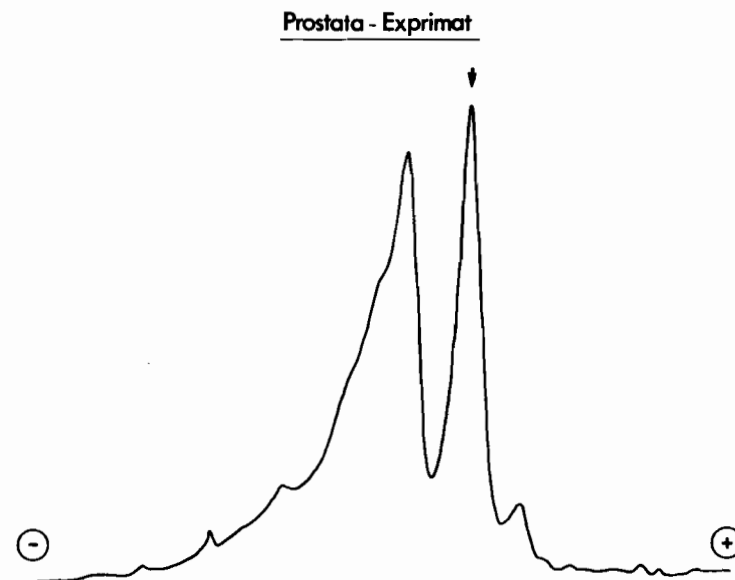


Abb. 17: Gradientengel-Elektrophorese von Prostataexprimat
 Der Pfeil markiert die Albuminbande

Auffällig sind zwei sehr hohe Banden, wobei nicht mit Sicherheit gesagt werden konnte, welche Bande dem Albumin entsprach. Durch Zumischung von hochgereinigtem Fumanalbumin konnte die mittlere und höchste Bande als Albumin identifiziert werden. Um die Bande links neben dem Albumin zu identifizieren, wurde in einem weiteren Versuch Lactoferrin zugemischt (40 bzw. 100 ng). Wie aus Abb. 19 zu ersehen ist, bildete Lactoferrin

Prostata-Exprimat

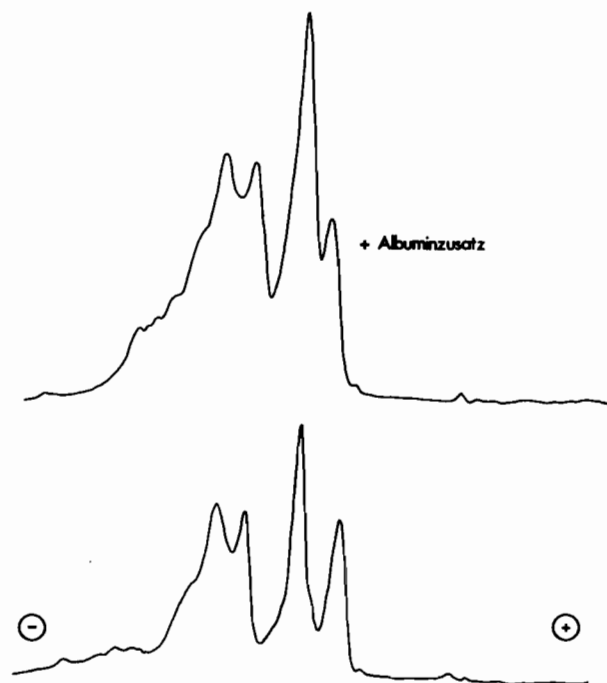


Abb. 18: Prostataexprimat
untere Kurve ohne - obere Kurve mit Albuminzusatz

eine neue Bande, die ursprünglich in dem Prostataexprimat 38/76 nicht vorhanden war. In Abb. 18 könnte das Lactoferrin allerdings der Bande direkt links vom Albumin entsprechen.

4.3.6. Molekulargewichtskorrelation mit Prostataexprimat

Da in Abb. 19 zwei Marker mit bekanntem Molekulargewicht zur Verfügung standen, ließ sich die Korrelationsrechnung zur Bestimmung von Semininen durchführen:

Prostata-Exprimat
(38/76)

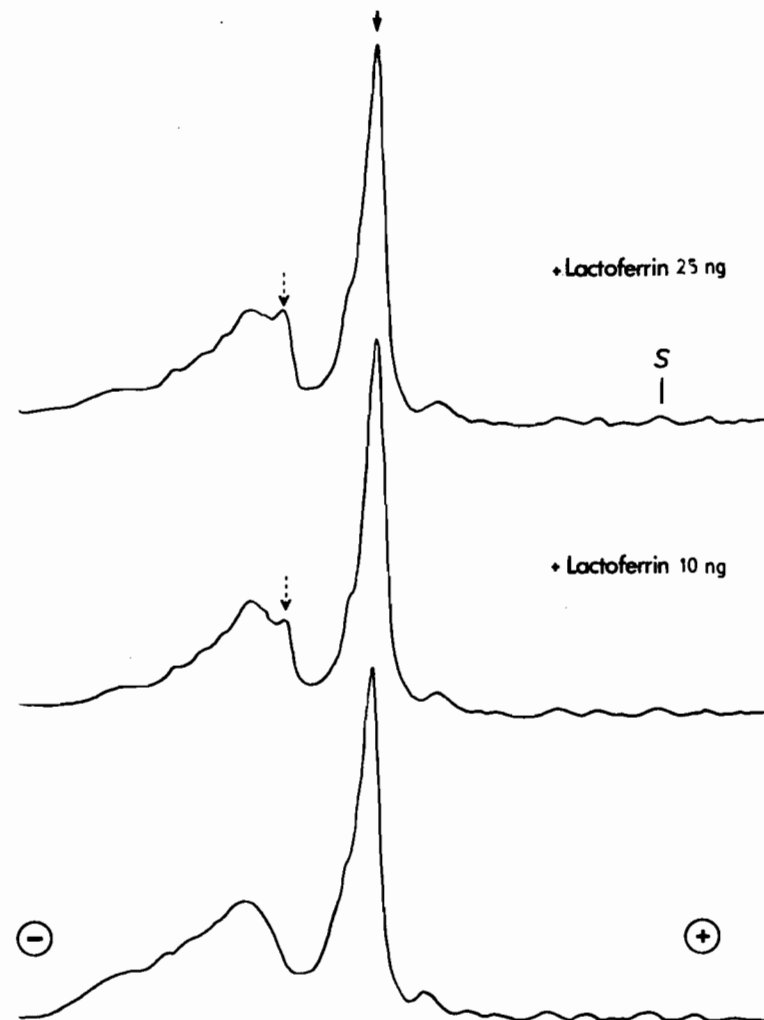


Abb. 19: Prostataexprimat - unten ohne - in der Mitte mit 10 ng
- oben mit 25 ng Lactoferrinzumischung
Gestrichelter Pfeil: Lactoferrin, S: Semininen
Fetter Pfeil: Albuminbande

	Wanderungsstrecke	ln MG
Lactoferrin	$x_1 = 08,0$	$y_1 = \ln 90\ 000$
Albumin	$x_2 = 10,6$	$y_2 = \ln 69\ 000$

$y = \ln MG = 12,2 - 0,102 x.$

Die Seminbande in Abb. 19 ist durch S markiert.

4.4. Elektrophorese der einzelnen Genitalsekrete

4.4.1. Prostataexprimat

4.4.1.1. Prostatitis

Prostata-Exprimat bei Prostatovesiculitis

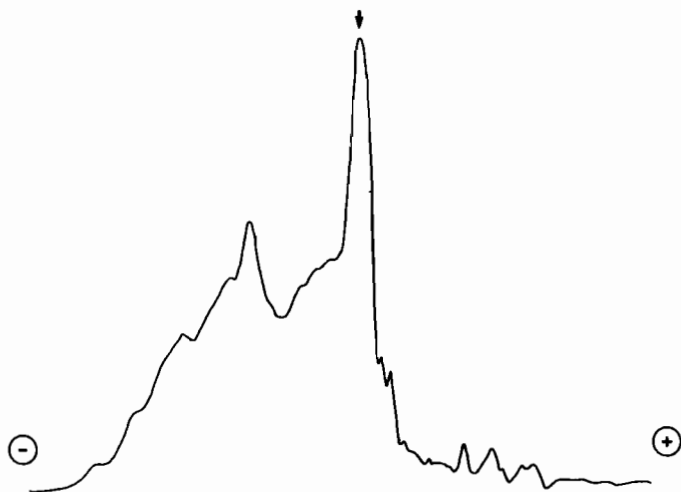


Abb. 20: Prostataexprimat bei Prostatovesiculitis
Albumin ist durch den Pfeil markiert

Das Proteinmuster des Prostataexprimates bei Prostatovesiculitis zeigt Abb. 20. Es fällt das Vorhandensein weiterer hochmo-

lekularer Banden im β -Globulin- und IgG-Bereich auf, ferner kommen schnell wandernde Banden rechts vom Albumin neu hinzu.

Prostata-Exprimat bei Ca.

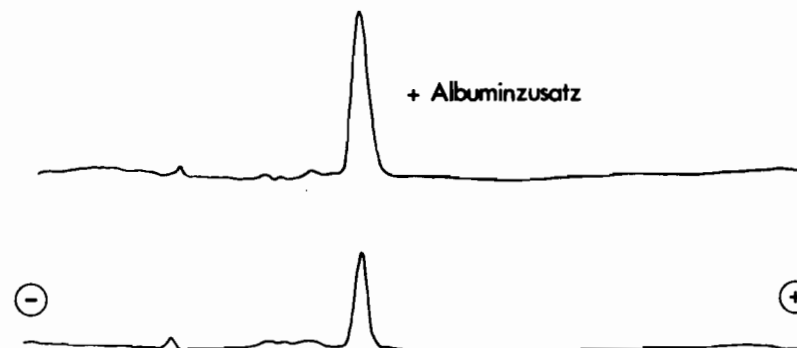


Abb. 21: Prostataexprimat bei Prostatakarzinom

Hodenbiopsie

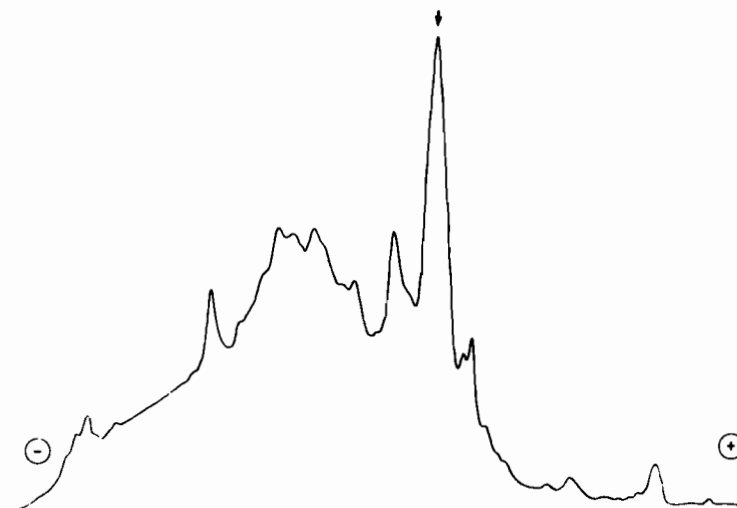


Abb. 22: Hodengewebshomogenat nach Hodenbiopsie
Die Albuminbande ist durch einen Pfeil markiert

4.4.1.2. Prostatakarzinom

Das Proteinmuster des Prostataexprimates bei Prostatakarzinom zeigt Abb. 21. Neben wenigen sehr kleinen Banden existiert nur eine größere Bande, die bei Zumischung von Albumin als Albumin identifiziert werden konnte.

4.4.2. Hodengewebe

Bei verschiedenen Hodengewebshomogenaten wurden beträchtliche Variationen im Proteinmuster beobachtet, die sich nicht mit unterschiedlichen histologischen Hodenbiopsiebefunden oder Spermiogrammbefunden korrelieren ließen. Die Abbildungen 22 und 23 geben zwei Beispiele des Proteinmusters von Homogenat menschlichen Hodengewebes mit normaler Histologie. Die Albuminbande mit höchster Amplitude ist deutlich zu sehen. Weitere hochmolekulare Banden sind erkennbar, wovon eine möglicherweise identisch ist mit einer Proteinbande, die bei Untersuchungen am Splitejakulat und am Spermaplasma vor und nach Vasektomie (s.u.) den Hoden- / Nebenhodenproteinen zugeordnet werden konnte.

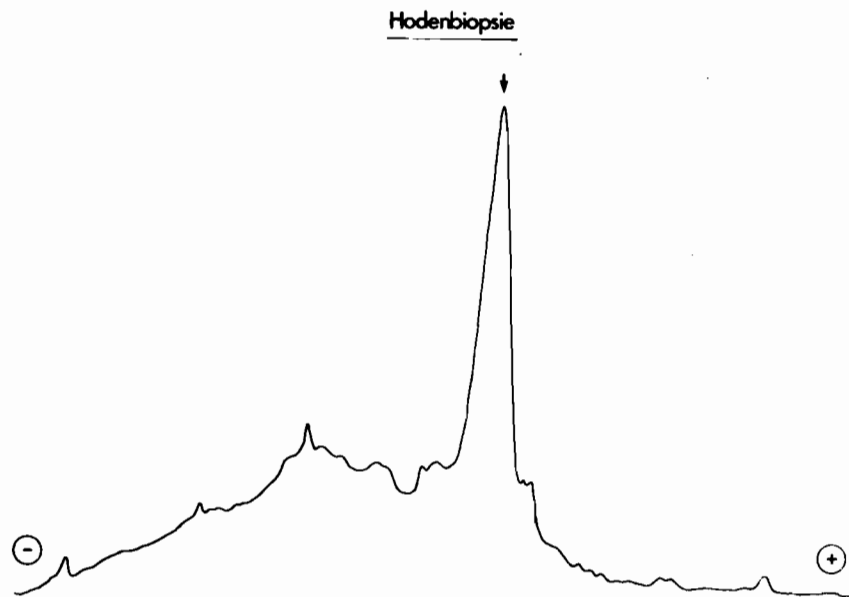


Abb. 23: Hodengewebshomogenat nach Hodenbiopsie - Pfeil $\hat{=}$ Alb.

4.4.3. Spermatozoen

Abb. 24 zeigt das Ergebnis eines Detergentienextraktes menschlicher Spermatozoen. Zahlreiche hochmolekulare Proteine links neben der Albuminbande sind zu sehen; insgesamt können 21 Proteinbanden nachgewiesen werden. Die Trennung der einzelnen Banden ist jedoch nicht sehr scharf, was unter anderem auf das Vorkommen zahlreicher Lipoproteine der Spermatozoenmembranen zurückzuführen ist.

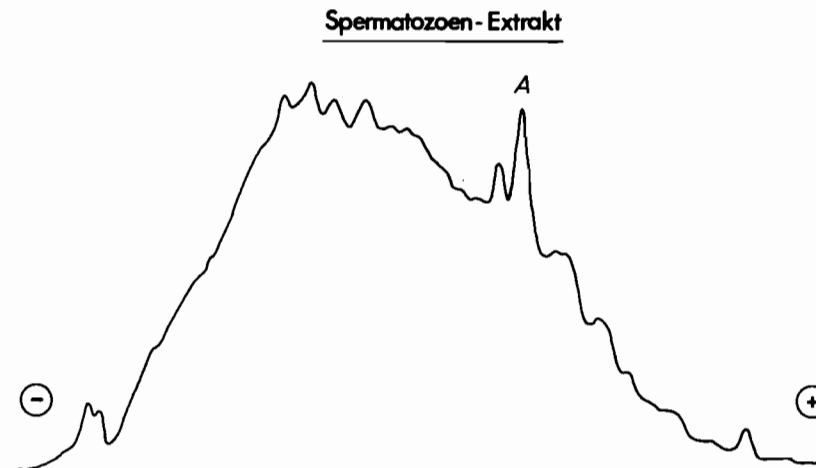


Abb. 24: Detergentienextrakt menschlicher Spermatozoen
A entspricht der Albuminbande

4.4.4. Spermaplasma - Zuordnung der Proteinbanden des Spermaplasmas zu den einzelnen Genitalsekreten

4.4.4.1. Einfluß der Vasektomie auf das Proteinmuster des Spermaplasmas

Das Proteinmuster von Spermaplasma wurde an einem Beispiel in Abb. 11 dargestellt. Um evt. spezifische Banden dem Hoden- / Nebenhodensekret zuordnen zu können, wurde von mehreren Patienten das Spermaplasma vor und nach Vasektomie untersucht. Wenn Proteinbanden nach Vasektomie fehlen, können sie dem Hoden- / Nebenhodensekret zugeordnet werden.

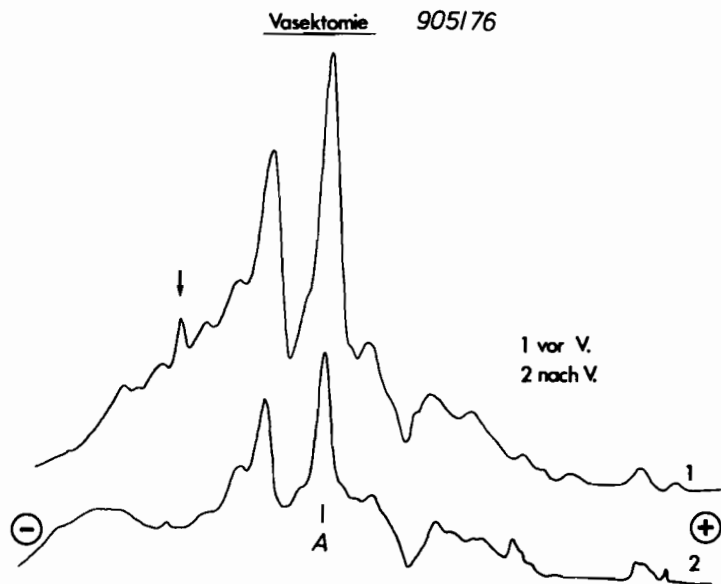


Abb. 25: Proteinmuster des Spermaplasmas eines Patienten vor (oben) und nach (unten) Vasektomie
 A: Albuminbande
 Pfeil: Bande, die nach Vasektomie fehlt

Abb. 25 zeigt an einem Beispiel das Proteinmuster des Spermaplasmas vor und nach Vasektomie. Es fällt auf, daß nach Vasektomie im hochmolekularen Bereich eine Bande fehlt (Pfeilmarkierung).

Der Befund war reproduzierbar, wie bei weiteren Patienten gezeigt werden konnte (Abb. 26 und 27).

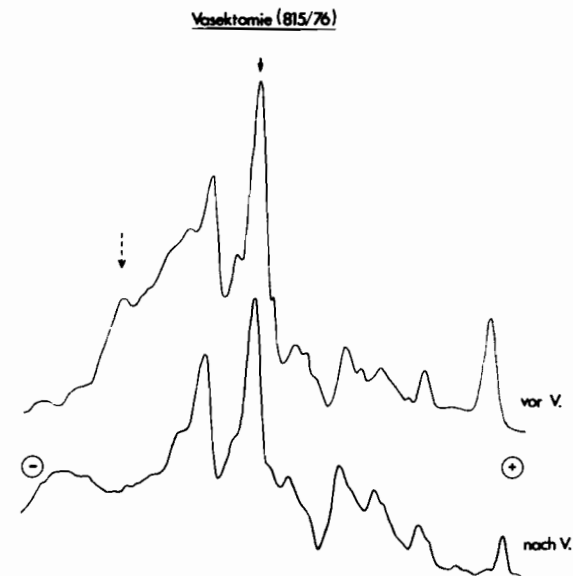


Abb. 26: Proteinmuster des Spermaplasmas eines Patienten vor (oben) und nach (unten) Vasektomie
 Fetter Pfeil: Albuminbande
 Gestrichelter Pfeil: Bande, die nach Vasektomie fehlt

4.4.4.2. Untersuchungen am Splitejakulat

Mit Hilfe der Splitejakulattechnik ist eine Zuordnung einzelner Proteinfractionen zu den verschiedenen akzessorischen Geschlechtsdrüsen möglich. Wenn das Ejakulat in drei Fraktionen aufgefangen wird, entsprechen die erste und zweite Fraktion dem Hoden- / Nebenhodensekret und dem Prostatasekret, die dritte Fraktion dem Bläschendrüsensekret (TAUBER, 157).

Abb. 28 zeigt als Beispiel das Proteinmuster eines Splitejakulates. In der ersten Fraktion wurden die meisten Spermatozoen nachgewiesen, so daß diese Fraktion das Hoden- / Nebenhodense-

Vasektomie

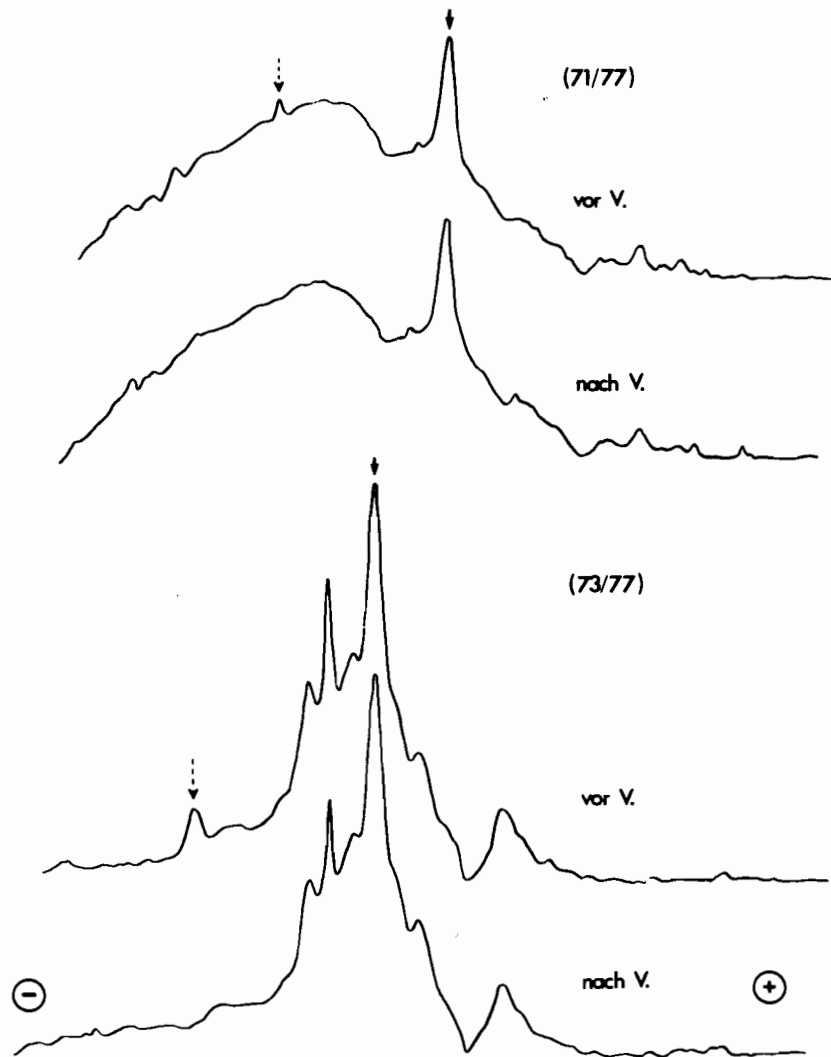


Abb. 27: Proteinmuster des Spermaplasmas von zwei Patienten vor (oben) und nach (unten) Vasektomie
 Fetter Pfeil: Albuminbande
 Gestrichelter Pfeil: Bande, die nach Vasektomie fehlt

Split - Ejakulat
(606/77)

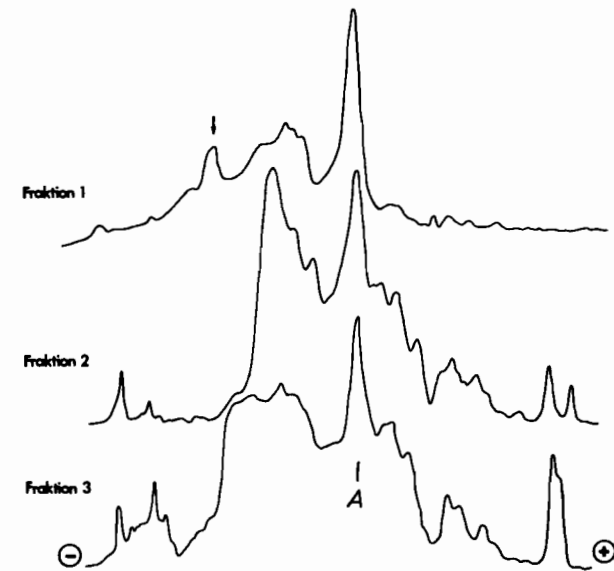


Abb. 28: Split-ejakulat eines gesunden Spenders, bestehend aus drei Fraktionen
 A: Albuminbande
 Fetter Pfeil: Bande, die dem Hoden- / Nebenhodensekret zugeordnet wird

kret enthalten mußte. Es fanden sich nur wenige niedermolekulare Banden; hingegen fiel eine hochmolekulare Bande auf (durch Pfeil markiert), die in dem Bereich liegt, wo nach Vasektomie eine Bande verschwindet. Dieses hochmolekulare Protein scheint in den Fraktionen zwei und drei zu fehlen. Statt dessen erscheinen in zunehmendem Maß niedermolekulare Proteine, die offenbar in der Bläschendrüse sezerniert werden. Eine breitbasige Schulter, die wahrscheinlich Glyko- und Lipoproteine aus der Bläschendrüse enthält, imponiert am deutlichsten in der dritten Fraktion.

Abb. 29 zeigt das Proteinmuster eines weiteren Split-ejakulates. Auch hier befanden sich in der ersten Fraktion die meisten

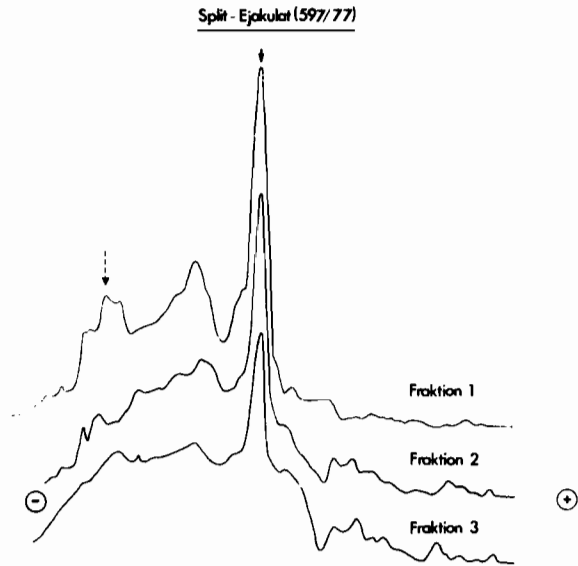


Abb. 29: Splitejakulat eines gesunden Spenders
 Fetter Pfeil: Albuminbande
 Gestrichelter Pfeil: Bande aus dem Hoden - / Neben-
 hodensekret

Spermatozoen, so daß die erste Fraktion wieder das Hoden - /
 Nebenhodensekret enthielt. Auch die Verteilung der Protein-
 banden in den einzelnen Fraktionen war ähnlich wie die in
 Abb. 28 gezeigten Muster.

Andere Splitejakulate wiesen in der zweiten Fraktion die mei-
 sten Spermatozoen auf. Ein Beispiel dafür gibt Abb. 30. Die
 hochmolekulare Bande (Pfeil) war jetzt in der ersten Fraktion
 klein, in der zweiten Fraktion dagegen am größten und in der
 dritten Fraktion nicht mehr zu identifizieren. Auch hier war
 die breitbasige Schulter links vom Albumin in der dritten
 Fraktion am deutlichsten ausgeprägt. Die niedermolekularen Pro-
 teine waren in allen Fraktionen nachweisbar, nahmen aber von
 Fraktion eins nach Fraktion drei deutlich zu.

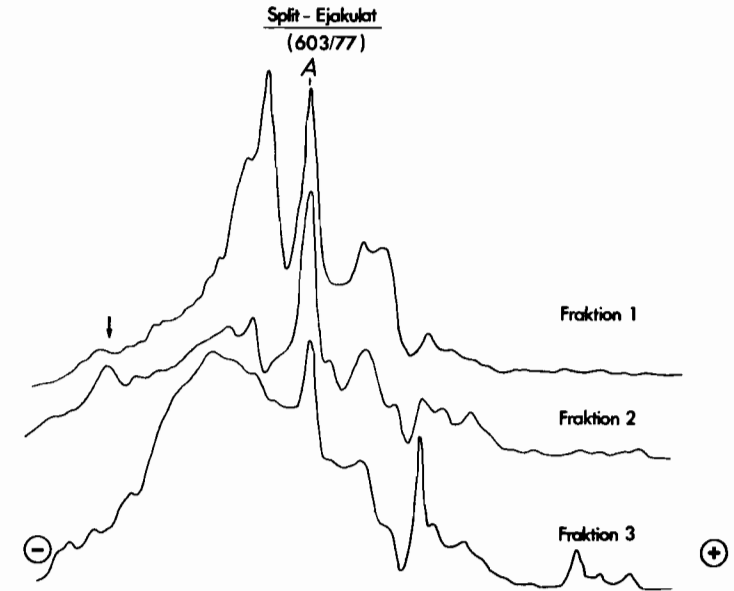


Abb. 30: Splitejakulat eines gesunden Spenders
 A: Albuminbande
 Fetter Pfeil: Bande aus dem Hoden - / Nebenhodensekret

Tab. 8: Spermigrammbefunde der Splitejakulate

Ejak. Nr.	Frakt.	Vol. (ml)	Konsist.	pH	Spermat.-zahl (Mio)	sehr gut / gut / nicht beweglich	Fructosegehalt
<u>606</u> 77	1.	0,8	normal milchig	6,7	15,0	40-30-30	1990
	2.	3,0	"	7,2	12,1	30-30-40	3790
	3.	0,5	"	7,2	8,4	00-40-60	4000
<u>597</u> 77	1.	1,2	"	7,0	87,0	40-20-40	1500
	2.	1,2	"	7,2	48,0	30-40-30	3060
	3.	1,4	"	7,2	20,0	10-40-50	3550
<u>603</u> 77	1.	1,0	"	7,0	90,0	50-20-30	2480
	2.	1,8	"	7,2	150,0	40-20-40	2980
	3.	1,2	"	7,2	37,0	20-20-60	3730

Die Spermiogrammbefunde der Splitejakulate sind in Tabelle 8 aufgeführt.

4.4.5. Spermatozelenflüssigkeit

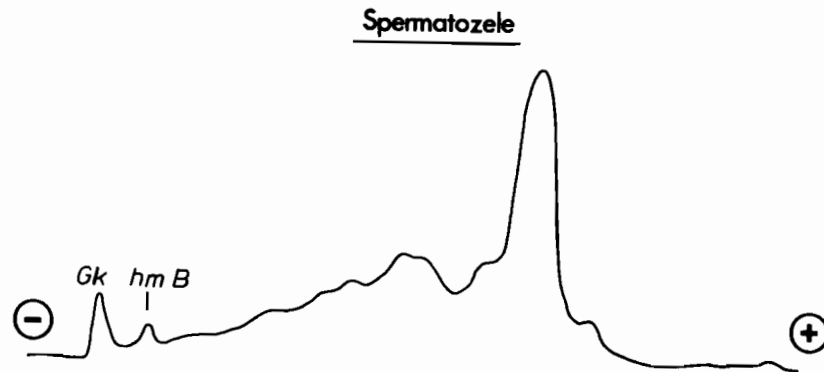


Abb. 31: Spermatozelenflüssigkeit
Gk: Gelkopf
hmB: hochmolekulare Bande

Bei der Elektrophorese von Spermatozelenflüssigkeit, die dem Nebenhodensekret annähernd entsprechen dürfte (Abb. 31), zeigte sich kurz hinter dem Gelkopf (erster Peak von links) eine Bande in dem Bereich, in dem nach Vasektomie eine Proteinbande fehlte.

Auch in einem weiteren Punktionspräparat (Abb. 32) ließ sich die genannte Bande nachweisen. Die höchste vorhandene Bande dürfte wieder dem Albumin entsprechen.

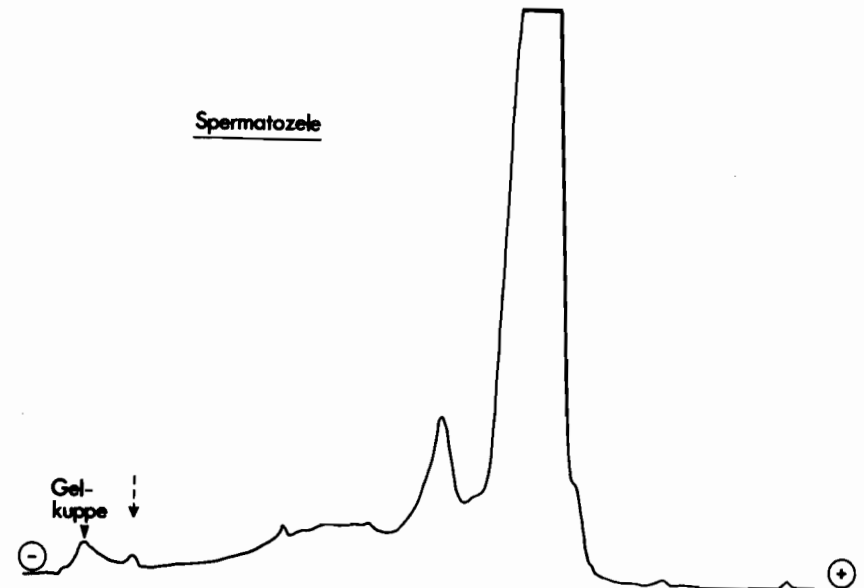


Abb. 32: Spermatozelenflüssigkeit
Markierung der hochmolekularen Bande durch gestrichelten Pfeil

4.4.6. Ductus deferens - Sekret

Das elektrophoretische Proteinmuster von Sekret aus dem Ductus deferens, das während einer Vasektomie intraoperativ gewonnen wurde, ist in Abb. 33 dargestellt. Die Hauptbande ließ sich durch Zumischung von hochgereinigtem Humanalbumin als Albumin identifizieren.

4.4.7. Bläschendrüsensekret

In Abb. 34 ist das Proteinmuster des Bläschendrüsensekretes, das durch Punktion der makroskopisch intakten Drüse während

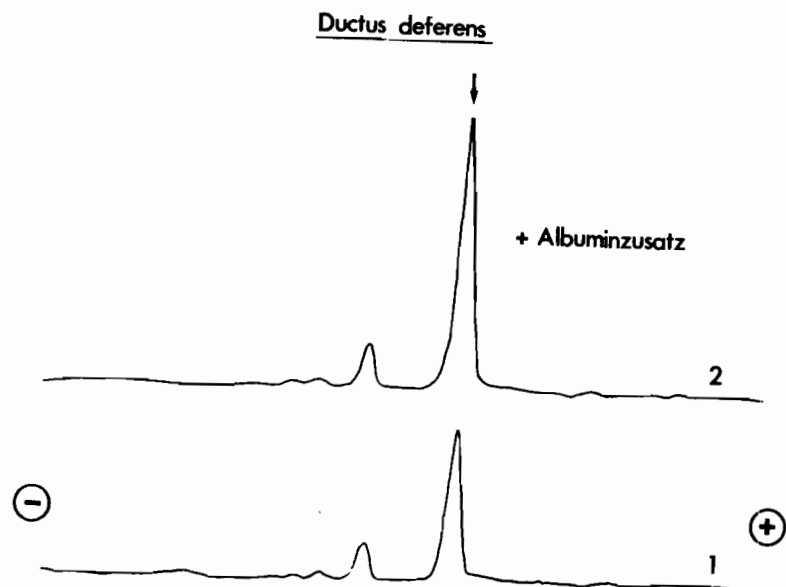


Abb. 33: Sekret aus dem Ductus deferens ohne (1) und mit (2) Albuminzusatz

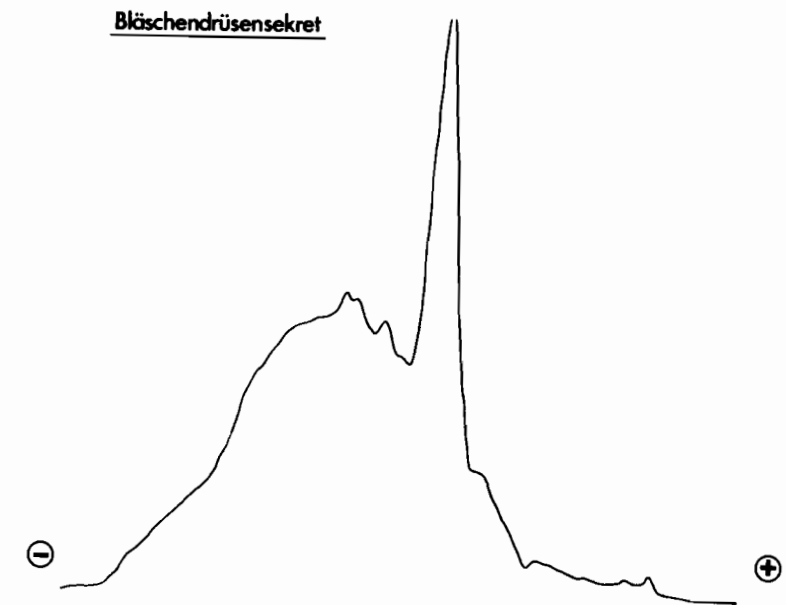


Abb. 34: Bläschendrüsensekret

der Operation eines Patienten mit Prostatakarzinom gewonnen wurde, dargestellt. Links von dem steilen Peak des Albumins imponiert eine breite Schulter, die wahrscheinlich Glyko- und Lipoproteine enthält, die sich auch im Gradientengel kaum trennen lassen.

Auffällig ist, daß das hier gezeigte Bläschendrüsensekret wenig niedermolekulare Proteine enthält. Da bei dem Patienten als Grundleiden ein Prostatakarzinom vorlag, ist zu bedenken, daß die sekretorische Funktion der Bläschendrüse bereits alteriert sein konnte.

Bläschendrüsensekret weiterer Patienten konnte nicht untersucht werden.

4.5. Androgenabhängigkeit der Spermaplasmaproteine

Zur Frage der Androgenabhängigkeit der Spermaplasmaproteine wurden Untersuchungen des Proteinmusters an Patienten vor und unter Antiandrogentherapie und an Patienten mit sekundärem Hypogonadismus unter Androgen- bzw. Gonadotropinsubstitution durchgeführt.

4.5.1. Antiandrogentherapie

Die antiandrogenbehandelten Patienten erhielten alle zwei Wochen 300 mg eines Cyproteronazetat-Depot-Präparates i.m. (Androcur^R - Depot, Schering AG).

Abb. 35 zeigt als Beispiel das Proteinmuster in der Mikro-Disk-Gradientengel-Elektrophorese vor und während Cyproteronazetattherapie. Die Albuminbande blieb in etwa erhalten, dagegen nahmen die niedermolekularen Proteine rechts vom Albumin, die vor der Therapie deutlich erkennbar waren, unter Antiandrogenbehandlung außerordentlich stark ab.

Auffällig ist ferner das Auftreten bzw. Ansteigen schnell wandernder Banden, die möglicherweise einen direkten Effekt des Cyproteronazetats darstellen.

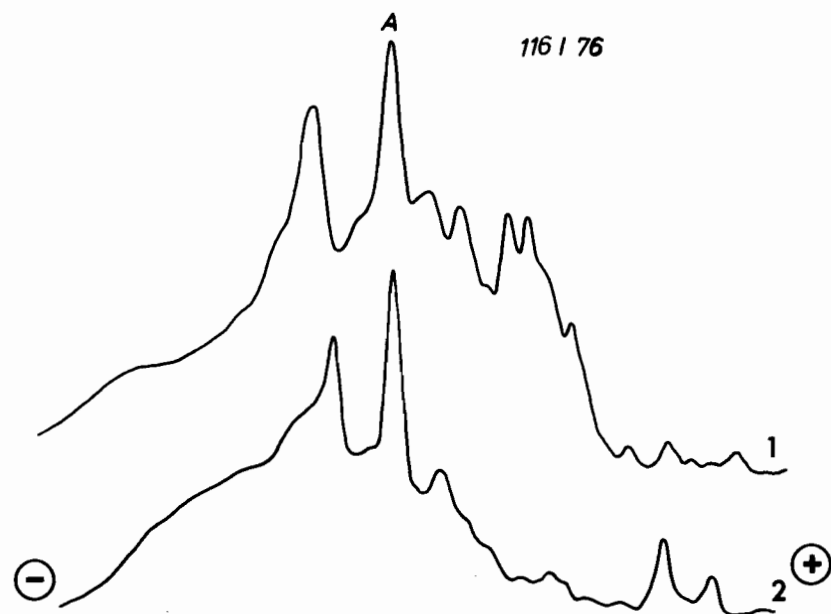


Abb. 35: Proteinmuster von Spermaplasma vor (1) und nach (2) sechswöchiger Antiandrogentherapie mit Cyproteronazetat

Ein weiteres Beispiel soll den Einfluß einer Antiandrogentherapie auf das Proteinmuster des Spermaplasma veranschaulichen (Abb. 36). Die niedermolekularen Proteine rechts vom Albuminpeak und die Bande direkt links vom Albuminpeak nahmen unter der Therapie sehr stark ab, während die Albuminbande wieder erhalten blieb, so daß sie im Densitogramm (2) der Abb. 36 deutlich hervortritt.

Die schnell wandernden Banden haben hier nicht wie im Beispiel von Abb. 35 zugenommen, sondern sind ungefähr gleich geblieben.

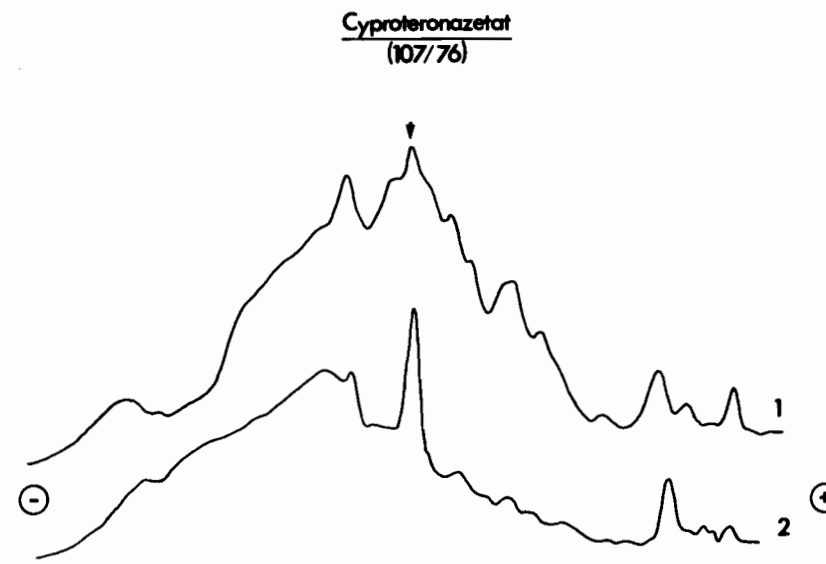


Abb. 36: Proteinmuster von Spermaplasma vor (1) und nach (2) sechswöchiger Antiandrogentherapie mit Cyproteronazetat

Bei einem Patienten war eine Verlaufsbeobachtung bis nach Beendigung der Behandlung möglich. Abb. 37 zeigt das Proteinmuster nach Mikro-Disk-Gradientengel-Elektrophorese vor, während und nach Abschluß der Behandlung mit Cyproteronazetat.

Auch hier nahmen die Banden rechts und links vom Albumin unter der Behandlung deutlich ab, während die schnell wandernden Banden ganz rechts unverändert blieben bzw. eine davon sogar anstieg. Nach Abschluß der Therapie hatten die Banden rechts und links vom Albumin geradezu überschießend zugenommen; von den schnell wandernden Banden ganz rechts war eine gleich geblieben, während die andere, die während der Therapie erhöht war, praktisch nicht mehr zu sehen war.

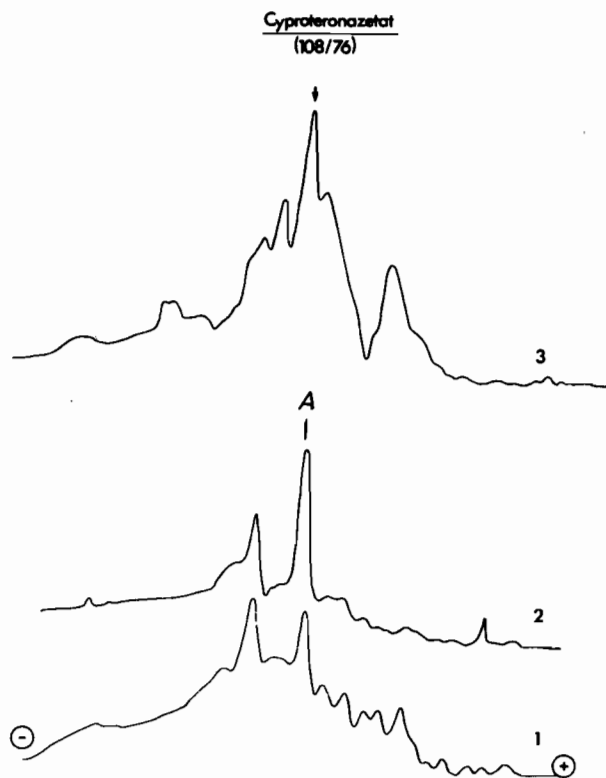


Abb. 37: Proteinmuster von Spermplasma vor (1) und nach (2) sechswöchiger Cyproteronazetattherapie, sowie fünf Monate nach Absetzen der Therapie (3)
A bzw. fetter Pfeil: Albuminbande

Die mittelschnell wandernden Banden rechts vom Albumin waren in (3) nicht so scharf getrennt wie in (1). Offenbar hatte sich das Proteinmuster nach Absetzen der Antiandrogentherapie noch nicht vollständig normalisiert.

4.5.2. Gonadotropinsubstitutionstherapie

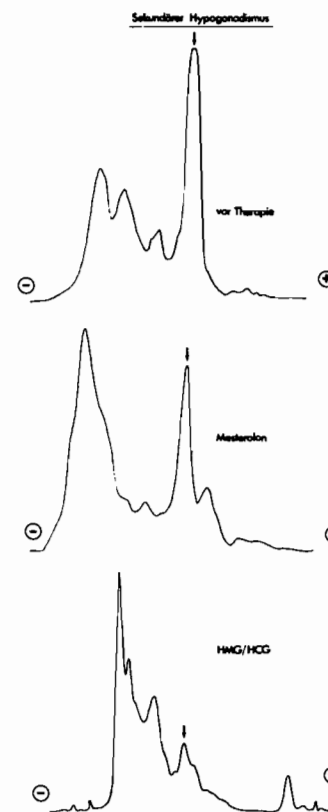


Abb. 38: Proteinmuster des Spermplasmas bei einem Patienten mit sekundärem Hypogonadismus vor Therapie, nach vierwöchiger Mesterolonapplikation und unter Substitutionstherapie mit Eumangonadotropinen (HMG/HCG für acht Monate)
Die Albuminbande ist durch den schwarzen Pfeil markiert

Untersuchungen des Proteinmusters bei einem Patienten mit sekundärem idiopathischem Hypogonadismus (Abb. 38) zeigten deutliche Unterschiede in der Proteinzusammensetzung vor Therapie, nach Behandlung mit 75 mg/die Mesterolone für vier Wochen und nach Therapie mit Humangonadotropinen (3 x 1 Amp. Pergonal 500 i.m./Wo. und 2 x 2500 I.E. Pregnesin 2500 i.m./Wo.) für acht Monate.

Die Albuminbande ist jeweils zur Orientierung durch einen Pfeil markiert. Die Banden rechts vom Albumin, die auf Antiandrogene mit Abfall reagierten, waren bei diesem Patienten vor der Therapie überhaupt nicht oder nur minimal vorhanden, traten unter Mesteroloneapplikation zum Vorschein und waren unscharf getrennt unter HMG/HCG-Therapie ebenfalls vorhanden. Im Vergleich zum Albumin waren sie dann jedoch weit höher konzentriert als vor der Therapie.

Im Elektropherogramm unter HMG/HCG-Therapie traten weitere schnell wandernde Proteine wie im normalen Spermaplasma auf. Sie lagen an der gleichen Stelle wie die Banden, die unter Cyproteronazetattherapie zugenommen hatten. Auch die hochmolekularen Proteine nahmen im Vergleich zum Albumin wesentlich zu.

Das Spermaplasma eines zweiten Patienten mit sekundärem Hypogonadismus infolge postoperativer HVL-Insuffizienz konnte vor Therapie und nach vierwöchiger sowie fünfmonatiger Therapie mit HMG/HCG (Dosierung wie oben) untersucht werden (Abb. 39).

Vor Beginn der Therapie waren rechts vom Albumin nur wenige kleine Banden vorhanden. Ebenso waren die hochmolekularen Proteine nur mäßig ausgeprägt. Lediglich die Albuminbande imponierte infolge ihrer Größe. Sie blieb während der Substitutionstherapie unverändert, während die niedermolekularen Proteine bereits nach einer vier Wochen dauernden Therapie sehr stark zunahmten. Nach fünfmonatiger Gonadotropinsubstitution hatten die schnell wandernden Proteine rechts vom Albumin weiter zugenommen. Aber auch die hochmolekularen Proteine links vom Albumin wurden vermehrt gebildet und in das Spermaplasma abgegeben.

Sek. Hypogonadismus

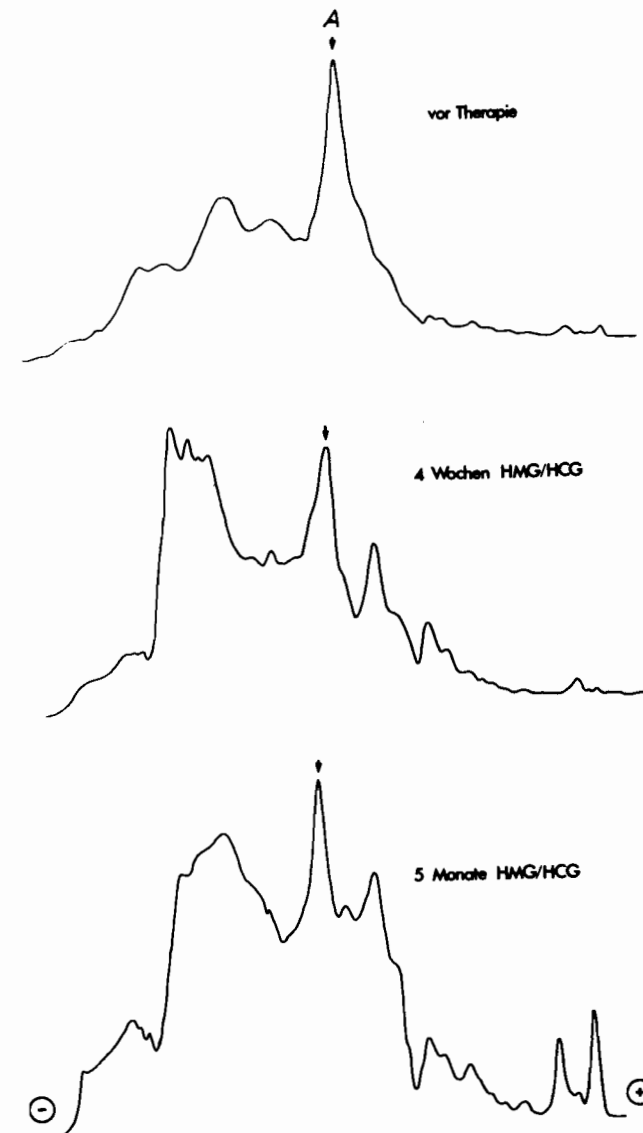


Abb. 39: Proteinmuster des Spermaplasmas eines Patienten mit sekundärem Hypogonadismus bei postoperativer HVL-Insuffizienz vor und während einer vier Wochen bzw. fünf Monate dauernden HMG/HCG-Therapie
A (Pfeil) entspricht der Albuminbande

5. DISKUSSION

=====

5.1. Leistungsvermögen der Mikrotechnik

5.1.1. Einführung

Die Mikro-Disk-Elektrophorese stellt eine hochempfindliche und trennscharfe Methode zur Fraktionierung von Proteinen dar. Wo nur wenig biologisches Material zur Verfügung steht, bietet sich diese Methode an.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Beispiel Material von Hodenbiopsien, Prostataexprimat oder z.B. Spermaplasma von Patienten mit sekundärem Hypogonadismus analysiert, die nur einen Tropfen Sperma ejakulieren konnten. Im letzteren Fall war die Ejakulatmenge zu gering, um andere biochemische Untersuchungen durchführen zu können. Auch das durch Punktion gewonnene Bläschendrüsensekret sowie die Sekrete aus dem Ductus deferens und dem Spermatozeleninhalt geben nur wenig Material her, so daß eine empfindliche Methode erforderlich war, die nur geringste Materialmengen für die Analyse benötigte.

Biochemische Untersuchungen mit Hilfe der Elektrophorese ließen bisher nur in ganz wenigen Fällen (etwa bei primärer Hodendysplasie) diagnostische Aussagen zu (DORN, 13). SCHIRREN (138) schlug vor, eventuell mit veränderter (er meinte stark erhöhter) Spannung weiterzuarbeiten.

Da es sich bei den zahlreichen Substanzen, die in den Genitalsekreten enthalten sind, zu einem großen Teil um Proteine handelt, bietet sich die Polyacrylamidgel-Elektrophorese für analytische Zwecke an. Besonders eignet sich der Mikromaßstab wegen der geringen zur Verfügung stehenden Materialmengen dazu.

Der Vorteil der Mikrotechnik liegt darin, daß neben dem geringen Materialeinsatz die Trenn-, Färbungs- und Differenzierungszeiten weit kürzer sind, so daß diese Methode schnell Ergebnisse liefert. Wie bei der Makromethode können auch im Mikromaßstab die Gele hinsichtlich ihrer Konzentration, des pH-Wertes, der Porengröße und des Vernetzungsgrades variiert und

an verschiedene Trennprobleme adaptiert werden. Die untere Nachweisgrenze für eine Einzelbande liegt bei 10^{-9} Gramm (NEUHOFF, 81, 83). Aus 1 ml einer Lösung, die 1 mg Protein enthält, können 5 000 bis 10 000 Elektrophoreseläufe durchgeführt werden. Elektrophoretisches Entfärben wie im Makromaßstab ist nicht nötig.

5.1.2. Elektrophorese hochgereinigter Proteine

Eine Vorstellung der Größenverhältnisse vermittelt Abb. 9, die eindrucksvoll die Kleinheit der verwendeten Gele illustriert. Mit etwas Geschicklichkeit und Übung ist es möglich, die Gele unter einem Mikroskop bei ca. acht- bis zehnfacher Vergrößerung zu handhaben, zu fotografieren und auszuwerten. Auch die Densitometrie ist möglich.

5.1.3. Blutserumelektrophorese und Spermaplasmaelektrophorese

Die Trennschärfe wird am Beispiel der Gradientengel-Elektrophorese von Blutserum (Abb. 10) demonstriert. Das Muster der Blutserumproteine stimmt mit den bekannten Elektropherogrammen anderer Autoren überein (PASTEWKA et al., 98, PEACOCK et al., 99, FELGENHAUER, 22-25, HOFFMEISTER und SCHÜTT, 42 und MAURER, 72). Das Proteinmuster hängt freilich sehr von den jeweils zugrundeliegenden methodischen Bedingungen ab, wie Konzentration, Vernetzungsgrad, Elektrophoresezeit, Färbung etc.

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird schon lange dazu benutzt, ein Serum den verschiedenen Haptoglobintypen Hp 1-1, 2-1 oder 2-2 und den Gc-Typen Gc 1-1, 2-1 oder 2-2 zuzuordnen, Paraproteine zu erkennen und verschiedene Serumproteine zu analysieren und quantitativ zu bestimmen.

Wie in Abb. 10 dargestellt, lassen sich 29 Proteinbanden im Blutserum differenzieren. Die Proteine sind von links nach rechts gewandert, links befinden sich also die hochmolekularen, rechts die niedermolekularen Proteine. Die Albuminbande ist als höchster Peak deutlich erkennbar. Rechts davon zwischen Albumin und Präalbumin zeigt sich eine weitere Bande, die wahrscheinlich dem sauren alpha-1-Glykoprotein entspricht (MAURER, 72).

Dieses Serumprotein ist in den konventionellen Elektrophoresen nicht darzustellen; infolge der hohen Polyacrylamidkonzentration in diesem Bereich des Gradientengeles kann auch dieses Protein noch differenziert werden. Denn bestimmte Plasma- wie auch Zellproteine können durch ein Polyacrylamidgradientengel besser getrennt werden als im homogenen Polyacrylamidgel (MAURER, 72).

Im Gegensatz zum Blutserum lassen sich im Spermaplasma (Abb. 11) weit mehr niedermolekulare Proteine nachweisen. Auch QUINLIVAN (103) sowie GARNER und EHLERS (28) fanden bei der alkalischen Disk-Elektrophorese am Polyacrylamidgel im Makromaßstab im Spermaplasma verglichen mit Blutserum mehr Fraktionen, die schneller als Albumin wandern, wobei QUINLIVAN (103) menschliches Spermaplasma und GARNER und EHLERS (28) Spermaplasma von Rindern und Schafsböcken untersucht hatten.

MISCHLER (75) konnte im Spermaplasma des Menschen wenigstens zehn Proteinkomponenten diskelektrophoretisch nachweisen. DAVAJAN und KUNITAKE (9) beschrieben bei der Disk-Elektrophorese von menschlichem Spermaplasma fünfzehn Banden. HERRMANN (37) konnte im menschlichen Spermaplasma immunoelektrophoretisch wenigstens neun bis elf Proteine unterscheiden. LAVON und BOURSNEILL (60) wiesen mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Makromaßstab bei pH 4,5 acht, im alkalischen System bei pH 8,6 elf verschiedene Proteinbanden im Spermaplasma des Ebers nach.

Unter Benutzung der "moving boundary - Technik", Papier-Elektrophorese, Geldiffusion und Zelluloseazetat-Elektrophorese waren vorher sechs bis neun Proteine im Spermaplasma des Menschen nachgewiesen worden (GRAY und HUGGINS, 32, ROSS et al., 113, KELLER und TSCHUMI, 54, SCHNEIDER et al., 144, WEIL et al., 162, HERMAN G., 35 und 36, ROA und SADRI, 110, RABACH, 104, ROZIN et al., 114, KLOPSTOCK et al., 56, SEARCY et al., 145).

Die Bandenmuster, die bei der Mikro-Disk-Elektrophorese von Spermaplasma am Polyacrylamidgradientengel gefunden wurden, waren von den in der Literatur beschriebenen am ehesten mit

denen vergleichbar, die QUINLIVAN (103), GARNER et al. (29) und LAVON und BOURSNEILL (60) bei der Disk-Elektrophorese im Makromaßstab mit alkalischen Elektrophoresesystemen und homogenen Konzentrationen erhalten hatten. Das elektrophoretische Proteinmuster von MISCHLER und REINEKE (75) zeigt weniger Banden und eine andere Anordnung. Die Unterschiede mögen darauf zurückzuführen sein, daß MISCHLER und REINEKE (75) 32 Stunden alte Ejakulate verwendeten, die nur teilweise im Kühlschrank gelagert waren. Nicht nur die Elektrophoresetechnik, sondern auch die Aufbereitung der Proben ist für die Vergleichbarkeit der bei der Elektrophorese erzielten Bandenmuster von Bedeutung.

Über die optimale Zentrifugationsdauer und -geschwindigkeit von Ejakulat zur Herstellung spermatozoenfreien Spermaplasmas finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. JECHT und POON (48) befaßten sich speziell mit diesem Problem und fanden, daß bis 2800 g die Überstände fast regelmäßig mit Spermatozoen kontaminiert waren. Bei 10 000 g waren nur noch extrem wenige Spermatozoen im Überstand, und bei 40 000 g waren die meisten Überstände spermatozoenfrei. JECHT und POON (48) empfahlen, die Ejakulate durch Millipore Filter mit 0,45 µm Porendurchmesser zu filtrieren, da der benötigte Druck mäßig, die Rückgewinnung mit ein bis zwei Drittel gut und im Filtrat keine Spermatozoen nachweisbar waren.

Da in der vorliegenden Arbeit jedoch mit Ejakulatmengen unter 1 ml, oft im Bereich von Mikrolitern gearbeitet wurde, wäre der Totraum in den Injektionsspritzen zu groß und die Rückgewinnung zu gering gewesen. Der Gebrauch von Millipore Filtern war daher nicht möglich. Eine allzu hohe Umdrehungszahl bei der Zentrifugation sollte vermieden werden, um die Spermatozoen nicht zu schädigen und ein "Auslaufen" von Spermatozoeninhalt in das Spermaplasma zu verhindern. Die Zentrifugation der Ejakulate bei 16 000 g für 10 Minuten erschien daher als beste Lösung.

5.2. Optimierung der Trennergebnisse

5.2.1. Technische Details der Elektrophorese

Polyacrylamid ist das Polymerisationsprodukt aus Acrylamid und N-N'-Methylenbisacrylamid. Die Eigenschaften der Polyacrylamidgele lassen sich in weiten Grenzen variieren: Ionenstärke, pH-Wert, Porengröße, Dichte, Vernetzungsgrad, Elastizität, Viskosität, mechanische Stabilität und Klebrigkeit. Diese physikalischen und chemischen Größen sind abhängig vom Mischungsverhältnis der Grundsubstanzen, von der Art der Polymerisationssysteme sowie von weiteren technischen Gegebenheiten. Dabei dürfen die Katalysatoren der Polymerisation die gewählten Puffersysteme, die elektrische Leitfähigkeit sowie die mechanischen Geleigenschaften nicht beeinflussen.

Von den herkömmlichen Katalysatorsystemen hat Ammoniumperoxydisulfat den Vorteil, wenig molekularen Sauerstoff zu entwickeln (MAURER, 72) und in konzentrierter Lösung über lange Zeit stabil zu sein (RÜCHEL et al., 117). Die Kombination von Ammoniumperoxydisulfat und TEMED liefert auch bei Mikrogelen gute Ergebnisse, während das sonst häufig benutzte Riboflavin-TEMED-UV-Licht-System im Mikromaßstab zu schlechteren Trennergebnissen führt (NEUHOFF, 83).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher Ammoniumperoxydisulfat und TEMED als Katalysatorsystem verwendet. Der pH-Wert des Trenngels betrug 8,8 in den Elektrophoresesystemen nach ORNSTEIN (96) und DAVIS (10) sowie ALLEN (2). Die Ionenstärke wurde relativ hoch eingestellt (Gelpuffer A₁ mit 350 mM Triskonzentration im Gel nach WOLFRUM et al., 168), da davon die Bandenschärfe abhängt. Die Elektrophorese kann im Mikromaßstab in den 5 µl Micro-Caps unter sehr günstigen Größenverhältnissen ablaufen, da das Verhältnis der Oberfläche zum Querschnitt hoch ist und dadurch eine gute Abgabe der bei der Elektrophorese entstehenden Joule'schen Wärme gewährleistet ist (RÜCHEL et al. 117). Allerdings sollte ein Elektrophoresestrom von 80 µA nicht überschritten werden. Dann kann durch eine relativ hohe Stromstärke und kurze Elektrophoresezeit eine hohe Bandenschärfe erzielt werden.

Bei der Gradientengelelektrophorese nach dem System von ALLEN et al. (2) ist während des "steady state stacking", das der eigentlichen Trennung vorausgeht, die Form der Banden bei Entwicklung eines Wärmestaus gefährdet. Deshalb wurde in diesem Zeitraum eine niedrigere Spannung von 80 Volt angelegt. Bandenunschärfen durch Diffusion sind dabei nicht zu befürchten, da die Proteinmoleküle nach der Beweglichkeit geordnet als feine Scheiben ("discs") eng hintereinander wandern, wobei die Konzentration der Probenmoleküle in diesen sogenannten "discs" von der Ionenstärke des "leading ions" abhängt.

Die Isotachyphorese findet aber im System nach ALLEN et al. (2) nicht in einem eigenen Gel statt, sondern zum Teil in einem Bereich über dem Trenngel, der nur durch hohe Saccharosekonzentration stabilisiert ist. Wenn hier ein Wärmestau entsteht, würde er zur schlierenförmigen Verformung der "discs" und damit der Banden führen.

Während der Elektrophorese sinkt der Strom laufend ab und eine konstante Spannung von 80 Volt würde zu einer relativ langen Elektrophoresezeit führen. Da die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der Gradientengelelektrophorese nicht von der Konstanz der angelegten Spannung abhängt, kann die angelegte Spannung auf 160 Volt verdoppelt werden, sobald die Bromphenolrotbande als scharfer "disc" in das Trenngel eingetreten ist. Damit verkürzt sich derjenige Teil der Elektrophorese, in dem durch Diffusion Bandenunschärfe entstehen kann. RÜCHEL et al. (117) beschreiben Fälle, in denen von den Probenproteinen sogar Spannungen von 300 V/cm toleriert wurden.

Gestoppt wird die Elektrophorese, wenn die markierende Bromphenolrotbande 1 mm oberhalb der konzentriertesten Stelle im Gel steht. Durch die rechtzeitige Beendigung wird vermieden, daß niedermolekulare Proteine durch das Gel durchlaufen und damit verloren gehen.

Sollten nach dem Elektrophoreselauf einzelne Banden nach unten konvex verzogen sein, deutet dieses Phänomen auf zu hohe Stromstärke und Wärmestau hin. Sind die Banden nach oben kon-

vex verzogen, so ergibt sich daraus der Hinweis, daß das Gradientengel zu schnell auspolymerisierte, bevor in horizontaler Richtung der Konzentrationsausgleich zwischen den Lösungen D und A/C erfolgt war (RÜCHEL et al., 117).

Ein wesentlicher Faktor bei der Polyacrylamidgelelektrophorese ist die Gelkonzentration T, von der wiederum die günstigste Vernetzung C abhängt (MAURER, 72). Je kleiner der verwendete Geldurchmesser ist, desto höher müssen nach NEUHOFF (83) die Gelkonzentrationen sein, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Da sich jedoch die Verhältnisse im Makromaßstab nicht ohne weiteres auf die Mikrotechnik übertragen lassen, mußte die optimale Gelkonzentration T experimentell herausgefunden werden.

Je nach Molekülgröße bzw. Molekulargewicht der zu trennenden Proteine empfiehlt sich eine unterschiedliche Porengröße im Trenngel bzw. eine unterschiedliche Gelkonzentration T.

Wegen dieser Abhängigkeit wurde die Elektrophorese schon 1962 von SMITHIES (148) als Mittel zur Molekulargewichtsbestimmung vorgeschlagen. Durch Verwendung der SDS-Elektrophorese verbesserten SHAPIRO et al. (146) die elektrophoretische Molekulargewichtsbestimmung, da die SDS-Technik die Ladungsunterschiede praktisch aufhebt und ausschließlich die Größenunterschiede der Probenmoleküle während der Elektrophorese zur Geltung bringt. Sie errechneten eine Korrelation zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und dem Rf-Wert. RAYMOND und NAKAMICHI (105) entwickelten die Methode der orthogonalen Gel-elektrophorese, die durch TOMBS (160) und INGRAM et al. (47) weiterentwickelt wurde.

Eine zusätzliche Verbesserung erfolgte durch HEDRICK und SMITH (34), die nachwiesen, daß der Rf-Wert eines Proteins umgekehrt exponentiell mit der Gelkonzentration T korreliert. Wird der Logarithmus des Rf-Wertes gegen die Gelkonzentration aufgetragen, ergibt sich eine Gerade mit negativer Steigung. Die Steigung ist linear abhängig vom Molekulargewicht des Proteins, der γ -Abschnitt von dessen Ladung.

Die Vernetzung der Gele muß dabei konstant sein. WHITE und DORION (165) fanden zwar, daß Änderungen in der Vernetzung C nur geringe, nicht signifikante Änderungen im Diffusionskoeffizienten kleiner Moleküle im Polyacrylamidgel bewirkten. Auch RAYMOND und NAKAMICHI (105) sowie ORNSTEIN (96) und DAVIS (10) behaupteten, daß die Vernetzung C keine größere Rolle beim Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidgelelektrophorese spiele.

Dagegen zeigten HEDRICK und SMITH (34), daß die Vernetzung C den Diffusionskoeffizienten signifikant beeinflusst und damit eine wesentliche Rolle bei der Polyacrylamidgelelektrophorese spielt, abgesehen von ihrem Einfluß auf die mechanischen Eigenschaften der Polyacrylamidgele. Sie wiesen nach, daß der Rf-Wert eines Proteins von der Quadratwurzel der Vernetzung C linear abhängt.

5.2.2. Bestimmung der optimalen Gelkonzentration

Um die optimale Gelkonzentration T herauszufinden, wurde die Korrelation nach HEDRICK und SMITH (34) am Beispiel von Blutserum und Spermaplasma durchgeführt (Abb. 7 und 8).

Zur Bestimmung des Rf-Wertes war es nötig, die Lage der Pufferfront und der Gelkuppe nach der Elektrophorese zu bestimmen. Die Gelkuppe ließ sich im Densitogramm bei gleichzeitiger optischer Kontrolle des Geles erkennen, wie auch die Proteinbanden nach Färbung mit Amidoschwarz 10B gut im Densitogramm zu erkennen waren. Lediglich die Pufferfront stellte sich bei der üblichen Färbung nicht dar.

NEUHOFF (83) empfiehlt, die Gele nach dem Austreiben aus den Micro-Caps in Pyronin zu fixieren und zu färben und sie erst danach in die Amidoschwarz 10B - Lösung zu geben. Allerdings führt jede Vorfixation zu einer schlechteren Bandendarstellung, was wir bestätigen konnten. NOVOTNY (94) rät, vor dem Protein-auftrag direkt auf die Gelkuppe eine größere Menge Fluoreszein zu pipettieren und nach normaler Elektrophorese und Amidoschwarz 10B - Färbung eine zusätzliche Pyroninfärbung anzu-

schließen. Diese Methode dürfte allerdings die Trennkapazität und Trennschärfe der Mikro-Elektrophorese beeinträchtigen. Die Wanderungstrecke der Pufferfront vor der Gelfärbung auszumessen, ist nicht günstig, da die Gelkuppe kaum sichtbar ist, solange das Gel noch im Micro-Cap eingeschlossen und ungefärbt ist. Ferner nimmt es zu lange Zeit in Anspruch, so daß die Bandenschärfe infolge der Diffusion der unfixierten Proteine schlechter wäre. Schließlich kann die Gellänge sich bei der Fixation, Färbung und Differenzierung durch Schrumpfungs- und Schwellungseffekte noch ändern.

Es wurde daher das unter 3.7.6. beschriebene Verfahren angewendet, bei dem die Gele an der Stelle, wo die Pufferfront lag, zerteilt wurden.

Bei der Korrelation der Gelkonzentration T mit dem natürlichen Logarithmus des Rf-Wertes des jeweiligen Proteins ergab sich jeweils eine Gerade mit negativer Steigung, wobei die Korrelationskoeffizienten r annähernd gleich -1 waren und die Genauigkeit der Rf-Wert-Bestimmung belegten.

Für jede mögliche Kombination zweier Proteine lassen sich nach ROBBARD et al. (112) T_{μ} , T_{max} und T_{opt} berechnen. Bei der Gelkonzentration T_{μ} , die im Schnittpunkt von je zwei Korrelationsgeraden gegeben ist, erfolgt keine Trennung beider Proteine. Sie wandern gemeinsam und bilden eine Bande.

Wird die Durchschnittsgeschwindigkeit um $1/e$ ($e = 2,718$) reduziert, so werden beide Proteinbanden bei einer Gelkonzentration T_{max} maximale Trennung aufweisen.

Bei Berücksichtigung der Diffusionsunschärfe berechnet sich die optimale Gelkonzentration wie folgt:

$$T_{opt} = 2 T_{max} - T_{\mu}$$

Es gibt vier Möglichkeiten für jede Kombination zweier Proteine (BEDRICK und SMITH, 34):

- a) Ist $T_{\mu} = 0$, so unterscheiden sich die Proteine nicht in der Ladung, sondern nur im Molekulargewicht. Dieser Fall kommt praktisch nicht vor.

- b) Ist T_{μ} kleiner als 0, so erfolgt die Proteintrennung im Polyacrylamidgel synergistisch auf Grund von unterschiedlicher Ladung und Molekülgröße, d.h. um so besser, je höher die Gelkonzentration T ist. Dieser Fall war bei allen untersuchten Spermaplasmaproteinen und bei fünf Kombinationen von Blutserumproteinen gegeben.
- c) Existiert weder im negativen noch in einem sinnvollen positiven Bereich der Konzentration T ein Schnittpunkt T_{μ} , so sind die Geraden als parallel zu betrachten. Die Trennung erfolgt dann nur auf Grund von Ladungsunterschieden und ist bei $T = 0\%$ optimal. Solche Proteine sollten durch isoelektrische Fokussierung getrennt werden. Am pH-Gradienten werden die Proteine in einem großporigen, niedrig konzentrierten Gel fraktioniert, welches nur stützende Eigenschaften als Träger-substanz hat, aber keinen Molekularsiebeffekt ausübt. Dieser Trenntyp war bei drei Blutserumproteinen gegeben.
- d) Ist T_{μ} positiv und nicht zu groß, so kann man nach ROBBARD et al. (112) die optimale Trenngelkonzentration T_{opt} berechnen. T_{opt} betrug für die Proteinkombination 2-3 bzw. 2-4 des Blutserums 39,5 % bzw. 27 %.

5.2.3. Optimale Elektrophoresetechnik

5.2.3.1. Gradientengel-Elektrophorese

Wo sich eine optimale Trenngelkonzentration angeben ließ, lag diese also recht hoch. In den meisten der untersuchten Fälle war die Trennung synergistisch. Infolge dieser Ergebnisse empfahl sich für Untersuchungen am Blutserum und besonders am Spermaplasma eine hohe Gelkonzentration. Bei Verwendung einer hohen kontinuierlichen Gelkonzentration (etwa 30 bis 40 %) würden jedoch viele Proteine in der Gelkuppe stecken bleiben und nicht in das Trenngel wandern.

Solche hochkonzentrierten kontinuierlichen Polyacrylamidgele können also nur ein enges Spektrum von Proteinen aus einem

komplexen Gemisch wie Blutserum oder Spermaplasma optimal trennen. Diese Überlegungen führen zur Entwicklung eines Konzentrationsgradienten im Polyacrylamidgel.

Schon 1972 wurde von MAURER und ALLEN (73) ein Stufengradientensystem mit anionischer Diskontinuität empfohlen. Ein Polyacrylamidgel mit kontinuierlichem Konzentrationsgradienten im Mikromaßstab wurde von RÜCHEL et al. (117 - 119) und WOLFRUM et al. (168) beschrieben und in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Da das Gradientengel im Bereich des Gelkopfes eine Konzentration von 1,2 % hat, reicht die Porengröße aus, um alle Proteine des Blutserums und des Spermaplasmas durchwandern zu lassen. Kontinuierlich ansteigend erreicht die Polyacrylamidkonzentration am Gelende 40 % und erlaubt dadurch eine hervorragende Trennung der meisten Proteine, die diesen Gelbereich auch bei extrem langer Elektrophoreselaufzeit nicht überwinden können ("dead run", RÜCHEL et al., 117).

Wie wir zeigen konnten, sind im Spermaplasma auch einige niedermolekulare Proteine enthalten, die eine Gelkonzentration von 40 % durchlaufen können. Daher mußte im Falle der Elektrophorese von Spermaplasma die Gradientengelelektrophorese gestoppt werden, wenn die Pufferfront 1 mm vor dem dichtesten Gelbereich stand.

Ein weiterer Vorteil des Gradientengels ist die Möglichkeit der Verwendung zur Berechnung von Molekulargewichten (RÜCHEL et al., 117).

Die Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse am Gradientengel wird vor allem durch einen konstanten Durchmesser der Micro-Caps, identische Viskosität der Lösungen (d.h. gleiche Temperatur, gleiche Konzentrationen, Erwärmung der Lösung C vor Gebrauch, damit die Monomere vollständig in Lösung gehen), identische Haltung der Micro-Caps beim Eintauchen in die Lösungen, gleiche Eintauchtiefe, absolute Reinheit der Micro-Caps (wichtig für die konstante Einstromgeschwindigkeit der Lösungen in laminarer Strömung), jeweils identische Füllhöhe und zeitrechten Polymerisationsbeginn bedingt.

5.2.3.2. Isoelektrische Fokussierung

Erstaunlich war, daß im Spermaplasma keine Proteine gefunden wurden, deren Korrelationsgeraden parallel verliefen. Da besonders im Bläschendrüsensekret zahlreiche Glyko- und Lipoproteine enthalten sind, sollte in manchen Fällen eine bessere Trennung durch isoelektrische Fokussierung zu erreichen sein. Bei Proteinmolekülen mit definierter elektrischer Ladung des Proteinanteils, d.h. definiertem isoelektrischem Punkt, aber unterschiedlichem Zucker- oder Fettanteil wäre die Trennung durch isoelektrische Fokussierung optimal. Die Ergebnisse in der Literatur mit isoelektrischer Fokussierung an Platten und zylindrischen Gelen im Makromaßstab weisen ebenfalls darauf hin. LAVON und BOURSNELL (60, 61) und LAVON et al. (62, 63) erzielten mit isoelektrischer Fokussierung schärfere Trennungen von Spermaplasma des Ebers als mit Polyacrylamidgелеlektrophorese.

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen mit T_u kleiner als Null im üblichen Polyacrylamidgel scheint nicht auszureichen, um entsprechende Banden identifizieren zu können, mit denen sich die oben beschriebene Korrelationsrechnung durchführen ließe. Dies gilt besonders für die breitbasige Schulter mit unscharf getrennten Proteinen im Bläschendrüsensekret links vom Albuminpeak.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde der Versuch unternommen, in den 5 μ l-Micro-Caps die isoelektrische Fokussierung von Spermaplasma vorzunehmen.

Die Trennkapazität der Systeme nach NEUHOFF (83) und BISPINK (5) reichte jedoch nicht für die Trennung von Spermaplasmaproteinen im Mikromaßstab aus. Die Stabilität des Polyacrylamidgels war zu gering, um zu verhindern, daß Proteine in den kapillären Spalt zwischen Gel und Glasinnenwand hineinwanderten. Die Ampholine konnte in der angegebenen Konzentration offenbar nicht diejenige Menge Protein aufnehmen, die zur Darstellung einer Bande erforderlich gewesen wäre.

Vielleicht ließe sich die Ablösung der Gele von der Glasinnenwand während der Elektrophorese durch eine höhere Vernetzung C verhindern. Andererseits darf nicht die freie Beweglichkeit

der Probenmoleküle beeinträchtigt werden. Im System nach NEUHOFF (83) war zudem der Oberteil des Micro-Caps, der ebenfalls Ampholine enthielt, nicht durch ein Gel stabilisiert, so daß sich hier nur anfangs ein pH-Gradient aufbaute, der aber sofort wieder zusammenbrach. Da dann die unstabilisierte Ampholine nach unten wanderte, zerstörte sie im Verlauf der Elektrophorese auch den unteren pH-Gradienten.

Untersuchungen von BISPINK (5) ergaben, daß in diesem System nicht wie ursprünglich angenommen, ein pH-Gradient von pH 3-10, sondern nur ein weit kleinerer Bereich entsteht, und auch dieser Bereich nicht lange stabil ist.

Ferner kamen die Probenproteine mit der Schwefelsäure des anodischen Elektrodenpuffers in Berührung und wurden denaturiert.

Im System nach BISPINK (5) ist dieses Problem gelöst und es eignet sich noch besser für die Trennung der LDH-Isoenzyme, brachte jedoch ebenfalls keine positiven Ergebnisse bei der Trennung von Spermaplasmaproteinen.

Bei Messung von Enzymaktivitäten nach isoelektrischer Fokussierung wie z.B. beim LDH-Nachweis liegt die Nachweisgrenze bei 10^{-12} Gramm, d.h. noch tausendfach niedriger als bei Anfärbung der Banden mit Farbstoff. Ferner mußte bei Anfärbung der Proteinbanden nach isoelektrischer Fokussierung die Ampholine mit Trichloressigsäure ausgewaschen werden, um eine Untergrundfärbung zu vermeiden (FAWCETT, 21). Die Trichloressigsäure bewirkte aber eine Vorfixation der Proteine und damit eine schlechtere Anfärbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R 250. Da das Gel sehr großporig war, konnten möglicherweise kleinere Proteinmoleküle während des Auswaschens trotz der beginnenden Fixation aus dem Gel diffundieren.

LAVON und BOURSNEILL (60) hielten beim isoelektrischen Fokussieren Polyacrylamidgelplatten für besser geeignet als zylindrische Gele, da ungelöste Proteine als Präzipitat an der Auftragsstelle von Gelzylindern liegenblieben, während sie sich bei Platten über die ganze Länge verteilten. Die Platten zeigten einen klaren Hintergrund, was bei den Zylindern nicht der Fall war.

Trotzdem ist vorstellbar, daß es eine veränderte Methodik ermöglichen kann, die Trennungen von Blutserum, Spermaplasma o.ä. im Mikromaßstab mit isoelektrischer Fokussierung vorzunehmen, sei es durch veränderte Konzentrationen der Gelgrundsubstanzen, sei es durch Einpolymerisieren der Probenproteine in das Polyacrylamidgel. FAWCETT (21) arbeitete z.B. im Makromaßstab mit höherer Konzentration $T = 8\%$ und Vernetzung $C = 2,9\%$, während der Ampholinegehalt mit 1% um das vierfache niedriger war als bei NEUHOFF (83) und BISPINK (5).

5.3. Identifizierung einzelner Banden

5.3.1. Spermaplasma

5.3.1.1. Zumischung von definierten Proteinen

Die Identifizierung einzelner Proteinfractionen kann durch Analyse der Wanderungstrecke, durch Zumischung bekannter Proteine oder immunologisch erfolgen. Es gibt sonst kaum ausreichend empfindliche Methoden, um so geringe Mengen Protein, wie sie in den Einzelbanden nach der Elektrophorese vorliegen, zu charakterisieren (NEUHOFF, 78).

Durch Zumischung geringer Mengen von hochgereinigtem Humanalbumin zu Spermaplasma und nachfolgende Elektrophorese konnte Albumin identifiziert werden, das die größte Amplitude des Elektrophoresemusters aufwies (Abb. 12 und 13). BLENK und HOFSTETTER (6) hatten ebenfalls Albumin als größte Proteinfraction im Spermaplasma nachgewiesen. In einem weiteren Schritt konnte links vom Albumin das Lactoferrin identifiziert werden (Abb. 14).

5.3.1.2. Gelatinolyse

Zahlreiche Enzyme wurden bisher im Spermaplasma nachgewiesen (HERRMANN, W.P., 38). Proteolytische Enzyme sollten auf Grund ihrer gelatinolytischen Enzymaktivität lokalisiert werden. So kommt u.a. im Spermaplasma ein chymotrypsinähnliches Enzym (Seminin) vor, das kürzlich von SUOMINEN und NIEMI (153), SUOMINEN et al. (154), SYNER und MOGHISSI (155), FRITZ et al. (27) und von SUOMINEN (152) charakterisiert wurde.

Das Molekulargewicht konnte mit 30 000 bestimmt werden mit einer Schwankung zwischen 24 000 und 33 000 .

Da es chymotrypsinähnliche Aktivität aufweist, war zu erwarten, daß es Gelatine andaut und über ein gelatinolytisches Verfahren nachweisbar sein würde (RICK, 109).

GARNER et al. (29) und SCHLEUNING et al. (141) konnten im Makromaßstab durch enzymatische Reaktionen nach Elektrophorese von Spermatozoenextrakten Akrosin nachweisen, GARNER et al. (29) mit dem BANA-Fast Garnet GBC salt system bei pH 7,5 nach Elektrophorese bei pH 4,3, SCHLEUNING et al. (141) mit dem genannten System und mit gelatinolytischer Technik. Dabei erfolgte die Elektrophorese im sauren, die Inkubation zur Gelatinolyse im schwach alkalischen pH-Bereich, da Akrosin säurestabil ist und seinen Arbeitsbereich bei pH 7,5 hat.

Im Mikromaßstab konnte mit der Gelatinolyse jedoch keine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Bei niedrigem Gel-pH-Wert würde das säurelabile Semin in denaturiert werden, bei Gel-pH-Wert im Bereich des isoelektrischen Punktes erfolgte keine ausreichende Wanderung, der höhere Gel-pH-Wert (pH 7-8) lag in der Nähe des Arbeitsbereiches des Enzymes, so daß schon während der Elektrophorese und nicht erst nach Inkubation Enzym-Substrat-Reaktionen abliefen, welche den Lauf störten.

Beim Versuch, erst die übliche Elektrophorese im alkalischen System und anschließend eine Enzym-Substrat-Reaktion ablaufen zu lassen, diffundierten die Enzyme jedoch nicht aus den Gelen, so daß keine gelatinolytische Aktivität nachzuweisen war.

NEUHOFF (83) konnte zeigen, daß enzymatische Reaktionen im Polyacrylamidgel quantitativ streng linear abhängig sind von der Zeit und schloß daraus, daß keine enzymatische Aktivität durch Diffusion aus den Gelen verloren ging. NEUHOFF und SCHILL (84) und NEUHOFF (81-83) verwendeten eine spezielle Anordnung zur elektrophoretischen Elution, um Proteine aus Polyacrylamidgelen rückzugewinnen.

5.3.1.3. Molekulargewichtskorrelation

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Proteinen gaben RÜCHEL et al. (117) an: Bei der Gradientengelelektrophorese können die Wanderungstrecken mit den Molekulargewichten der wandernden Substanzen korreliert werden. Da diese Abhängigkeit umgekehrt exponentiell verläuft, ergibt sich bei semilogarithmischer Korrelation eine Gerade mit negativer Steigung ($x \hat{=} \text{Wanderungstrecke}$, $y \hat{=} \text{Logarithmus des Molekulargewichtes}$). Im Fall der Albuminligomere lieferte der Korrelationskoeffizient r ($r = -0,999$) einen Qualitätsnachweis für die Gradientengele.

Auf der anderen Seite ist damit die Identifikation einer Proteinbande auf Grund des Molekulargewichtes möglich, wobei allerdings mindestens zwei Markerproteine, deren Molekulargewichte bekannt sind, erforderlich sind. Durch die Bestimmung der relativen Wanderungstrecken läßt sich mit Hilfe einer Regressionsgeraden über das Molekulargewicht das gesuchte Protein durch die Wanderungstrecke x identifizieren: $\ln MG = f(x)$.

In Zumischungsversuchen waren die Banden von Albumin und Lactoferrin identifiziert worden. Dabei zeigte sich, daß Lactoferrin wie auch andere Proteine in sehr unterschiedlichen Konzentrationen im Spermaplasma enthalten war. Es war nicht in jeder Spermaplasmaelektrophorese sicher zu lokalisieren. Auch TAUBER (157) fand für Lactoferrin im Spermaplasma eine sehr weite Variationsbreite der Konzentrationen.

Mit Hilfe der Molekulargewichtskorrelation sollte die Seminbande identifiziert werden. Die Molekulargewichte des Albumins (69 000) und des Albumin-Dimers (138 000) sind bekannt. Die Angaben über das Molekulargewicht von Lactoferrin differieren in der Literatur von 75 000 bis 95 000. In den vorliegenden Berechnungen wurde ein Molekulargewicht von 90 000 für Lactoferrin angenommen.

Wäre der Konzentrationsgradient bei allen Gradientengelen immer exakt identisch, könnte diejenige Korrelationsgerade, die einmal an einem Gel errechnet wurde, zur Molekulargewichtsbe-

rechnung auch an anderen Gradientengelen verwendet werden. Um dies zu versuchen, wurde die mittlere Korrelationsgerade aus den Abbildungen 15 und 16 errechnet und damit die Korrelationsrechnung in den Abbildungen 11, 12, 13 und 14 durchgeführt. Für Seminin errechnete sich tatsächlich die jeweils gleiche, markierte Bande. Bei Übertragung einer Korrelationsgeraden von einem Gradientengel auf ein anderes sind die gemessenen Daten proportional umzurechnen, da die Laufstrecken und Abbildungsmaßstäbe nicht exakt identisch sind. Die Ergebnisse beweisen die hohe Reproduzierbarkeit der Gradientengele.

Die elektrische Ladung der Moleküle scheint bei der Molekulargewichtsbestimmung über die Gradientengelelektrophorese keine entscheidende Rolle zu spielen, da die Moleküle praktisch nicht mehr weiterwandern, wenn sie den ihrer Größe entsprechenden Platz erreicht haben (RÜCHEL et al., 117). Um Ladungseinflüsse auf die Molekulargewichtsbestimmung auszuschalten, hatten SHAPIRO et al. (146) die SDS-Elektrophorese verwendet.

Einen Einfluß auf die elektrophoretische Wanderung hat dagegen die Form der Moleküle; z.B. verhält sich Fibrinogen aus Rinderblut bei der Elektrophorese atypisch (THORUN, 159). Bei nicht näher definierten Proteinen ist durch Verwendung von Referenzproteinen nur eine approximative Bestimmung des Molekulargewichtes möglich (RÜCHEL et al., 117).

5.3.2. Prostataexprimat

5.3.2.1. Zumischung von definierten Proteinen

Das Proteinmuster des Prostataexprimates wies mehrere Banden auf, wobei durch die Zumischung von Humanalbumin die größte Bande als Albumin identifiziert werden konnte. Die Bande links vom Albumin, die in manchen Prostataexprimaten auch als Doppelbande auftrat, konnte nicht identifiziert werden. In Abb. 19 zeigte sich nach Zumischung von Lactoferrin eine neue Bande. Lactoferrin war also ursprünglich in diesem Prostataexprimat nicht nachzuweisen. Möglicherweise entspricht bei Auftreten der Doppelbande wie in Abb. 18 der rechte Anteil davon dem Lactoferrin.

Da Lactoferrin vor allem in der Bläschendrüse gebildet wird (TAUBER, 157), ist denkbar, daß es im Prostataexprimat in unterschiedlicher Menge enthalten ist, je nachdem wie viel Bläschendrüsensekret in das Exprimat gelangt ist.

5.3.2.2. Molekulargewichtskorrelation

In dem in Abb. 19 gezeigten Prostataexprimat standen Albumin und Lactoferrin als bekannte Marker für die Korrelationsrechnung zur Verfügung. Die markierte Bande wurde dem Seminin zugeordnet. Seminin stammt wahrscheinlich aus der Prostata (TAUBER, 158).

5.4. Elektrophoretische Proteinmuster der Genitalsekrete und Zuordnung der Spermaplasmaproteine zu den einzelnen akzessorischen Genitalorganen

Bei der Analyse von Spermaplasma unterschiedlicher Patienten fiel die Verschiedenheit der Elektrophoresemuster auf. Zwar ließ sich ein Basismuster erkennen, das individuelle Proteinmuster wurde jedoch stark durch die unterschiedliche sekretorische Tätigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und die unterschiedliche Mischung ihrer Sekrete bei der Ejakulation beeinflusst. Eine klare Beziehung zwischen dem Elektrophoresebefund und pathologischen Spermiogrammbefunden fand sich in unserem Untersuchungsgut nicht.

Auch DAVAJAN und KUNITAKE (9) konnten keine Unterschiede des Spermaplasmaproteinmusters nach Disk-Elektrophorese bei fertilen und infertilen Männern nachweisen, wie auch keine eindeutige Relation zwischen Zahl und Form der Spermatozoen, Volumen und pH-Wert des Spermas und Sperma- oder Serumcitrat nachgewiesen wurde (NIERMANN, 92).

Bei gezielten Fragestellungen muß Spermaplasma des gleichen Patienten z.B. vor, während und nach einer bestimmten Therapie untersucht werden. Auch bei der Elektrophorese von Hodenhomogenaten (Abb. 22 und 23) waren die Bandenmuster nicht mit unterschiedlichen Hodenbiopsie- oder Spermiogrammbefunden zu korrelieren.

Spermaplasmen von Patienten vor und nach Vasektomie sind in den Abbildungen 25 bis 27 gezeigt. Untersuchungen hierbei können evtl. Hinweise auf eine oder mehrere hoden- bzw. nebenhoden-spezifische Banden geben.

Bei den Spermaplasmen der untersuchten Patienten fehlte nach Vasektomie jeweils eine Bande im hochmolekularen Bereich (IgG-Bereich). Albumin schien nach Vasektomie etwas vermindert zu sein. DORN (13) fand, daß bei Verschuß des Ductus deferens im Elektrophoresediagramm nach Hochspannungspapier-elektrophorese die sonst kathodisch liegenden Fraktionen eins bis drei fehlten.

Bei den Splitejakulatuntersuchungen konnte die Proteinbande, die nach Vasektomie fehlte, jeweils der Fraktion zugeordnet werden, die am meisten Spermatozoen enthielt. Diese Fraktion enthielt auch jeweils die höchste Albuminbande. In den meisten Fällen (ca. zwei Drittel) ist es die erste Fraktion, sonst die zweite (TAUBER, 157). Da die Ejakulation in Schüben erfolgt, ermöglicht eine Fraktionierung des Ejakulates die Zuordnung der Bestandteile zu den einzelnen Geschlechtsdrüsen. Die ersten Ejakulatportionen bestehen vorwiegend aus Prostata- und Hoden-Nebenhodensekret, die letzten Portionen aus Bläschendrüsensekret. Dabei macht der Nebenhodenanteil weniger als 10 %, das Prostatasekret 20 bis 60 % und die Bläschendrüsensproduktion den Rest des Gesamtvolumens aus (MARBERGER, 71). Zusätzlich sind in der ersten Fraktion die Sekrete der Littré'schen und Cowper'schen Drüsen enthalten (SCHILL, 122). Damit stellen prinzipiell die Sekrete der Glandula vesiculosa und Prostata den größten Teil der Proteine im menschlichen Ejakulat zur Verfügung, wobei einige sofort nach der Ejakulation unter dem Einfluß von proteolytischen Enzymen aus dem Prostatasekret gespalten werden. LAVON et al. (63) konnte viele Proteine des Nebenhodens nicht im Spermaplasma identifizieren, beschrieb ihren Anteil am Spermaplasma als gering und führte dies auf die Verdünnung während der Ejakulation zurück.

Da in den ersten Fraktionen von Splitejakulaten nicht nur mehr Spermatozoen vorhanden sind, sondern diese auch besser beweglich und länger überlebensfähig sind (MacLEOD und HOTCH-

KISS, 67, FARRIS und MURPHY, 20, AMELAR und HOTCHKISS, 3), diskutierten ELIASSON und LINDHOLMER (16) die Möglichkeit, bei homologer Insemination qualitativ schlechter Ejakulate nur deren erste Portion zu benutzen.

Die hochmolekulare Bande, die nach Vasektomie fehlte und sich bei der Splitejakulattechnik immer der spermatozoenreichsten Fraktion zuordnen ließ, konnte auch in zwei Punktaten von Spermatozelen (Abb. 31 und 32) nachgewiesen werden, welche ihrem Inhalt nach am ehesten dem Nebenhodensekret entsprechen dürften. Auch im Spermatozoenextrakt war eine ganze Reihe hochmolekularer Proteine nachzuweisen. Die elektrophoretische Trennung des Detergentienextraktes menschlicher Spermatozoen wies 21 Banden auf, wobei allerdings die Abtrennung der einzelnen Proteine nicht sehr scharf war. Dies war wahrscheinlich auf die zahlreichen Lipoproteine aus der Spermatozoenmembran zurückzuführen, die bei Behandlung mit Detergentien extrahiert wurden und offenbar die Elektrophorese störten.

Ferner waren im Bandenmuster von homogenisiertem Hodengewebe (Abb. 22 und 23) zwei hochmolekulare Banden erkennbar. Ob eines dieser hochmolekularen Proteine mit dem identisch ist, welches nach Vasektomie im Spermaplasma fehlte und sich bei den Splitejakulaten der spermatozoenreichsten Fraktion zuordnen ließ, müßte immunologisch geklärt werden. Das Proteinmuster des Hodenhomogenates ähnelt dem des Serums, was wahrscheinlich auf die Kontamination des Hodenbiopsiematerials mit Blut zurückzuführen ist.

Im Ductus deferens fand sich nur eine größere Bande, die im Albuminzumischungsversuch als Albumin identifiziert wurde, sowie einige kleinere Banden.

Im Prostataexprimat (Abb. 17) und Bläschendrüsensekret (Abb. 34) fanden sich ebenfalls keine entsprechenden Banden im IgG-Bereich. Daher scheint diese hochmolekulare Bande, die nach Vasektomie fehlt und im Splitejakulat immer in der spermatozoenreichsten Fraktion auftritt und sich auch in der Spermatozelenflüssigkeit nachweisen läßt, dagegen im Prostataexprimat, Bläschendrüsensekret und Sekret aus dem Ductus deferens fehlt, spezifisch für das Sekret aus dem Hoden- / Nebenhoden zu sein.

In diese Richtung weist auch eine Beobachtung von KALOGEROPOULOS et al. (53), die fanden, daß im Ejakulat Proteine im IgG-Bereich signifikant mit der Spermatozoenmenge zunahm. Ferner fanden TAUBER et al. (157) IgG und IgA in der ersten Fraktion des Splittejakulates erhöht, in der sich auch die Masse der Spermatozoen befand. Gleichsinnig verhielt sich auch bei seinen Untersuchungen Albumin, das eine Abnahme von Fraktion I zu Fraktion III hin zeigte. Fructose und Lactoferrin nahmen dagegen von I nach III hin zu, was für ihren Ursprung aus der Bläschendrüse spricht.

Die dargestellte hochmolekulare Proteinbande ließe sich nach näherer Charakterisierung möglicherweise im Rahmen klinischer Fertilitätsuntersuchungen bei der Differentialdiagnose "Verschluß der ableitenden Samenwege" verwenden. Liegt beispielsweise als Ursache für eine Infertilität eine Azoospermie vor, muß differenziert werden, ob sie in einem derartigen Verschluß der ableitenden Samenwege oder in einer mangelnden Spermatozoenproduktion des Hodens begründet ist. Dazu sind Hormonuntersuchungen und gegebenenfalls eine Hodenbiopsie nötig.

Die von uns beobachteten zahlreichen niedermolekularen Proteinbanden des Spermaplasmas ließen sich mit Hilfe der Splittejakulattechnik eindeutig der dritten Fraktion und in geringerem Maß der zweiten Fraktion zuordnen und stammen damit aus dem Bläschendrüsensekret. Auch die als breitbasige Schulter imponierende Bande links vom Albumin ist am deutlichsten in der dritten Fraktion ausgeprägt. Sie enthält wahrscheinlich Glyko- und Lipoproteine aus der Bläschendrüse. Diese Substanzen lassen sich in der Gradientengelelektrophorese schlechter trennen. Die Technik der Wahl wäre hier die isoelektrische Fokussierung.

Bläschendrüsensekret vom Menschen zu gewinnen, ist nur operativ möglich und ist daher schwer zugänglich. Uns stand ein Operationspräparat, das während einer Prostataexstirpation wegen Prostatakarzinoms gewonnen wurde, zur Verfügung. Nach Punktion der makroskopisch intakten Glandula vesiculosa konnte eine geringe Menge von Bläschendrüsensekret abgesaugt werden. In der Gradientengelelektrophorese zeigten sich nur weni-

ge niedermolekulare Proteinbanden. Dies deckt sich mit der Beobachtung von LAVON et al. (63) und MANN (68), daß zahlreiche niedermolekulare Proteine im Spermaplasma erst während oder ganz kurz nach der Ejakulation durch Proteolyse entstehen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die sekretorische Funktion der Bläschendrüse infolge des Grundleidens des Patienten (Prostatakarzinom) bereits alteriert war, obwohl makroskopisch in der Bläschendrüse keine Veränderungen vorlagen.

Ein Beispiel für die Beeinflussung eines Organsekretes durch Entzündung und Karzinombildung wurde am Prostataexprimat gegeben. Wie BLENK und HOFSTETTER (6) zeigen konnten, treten im Ejakulat bei chronischer und besonders bei akuter Adnexitis vermehrt Serumproteine auf. Mit Hilfe der Immunelektrophorese konnte bei Kranken mit chronischer Adnexentzündung und Epididymitis alpha-1-Antitrypsin, Transferrin und IgG und bei Kranken mit akuter Adnexentzündung zusätzlich saures alpha-1-Glykoprotein, C3c, Coeruloplasmin und Haptoglobin nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten diese Serumproteine bei Gesunden oder bei Patienten mit vegetativem Urogenitalsyndrom nicht gefunden werden.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Mikro-Disk-Elektrophorese von Prostataexprimat bei Prostatovesiculitis (Abb. 2o). Auffällig war das Auftreten mehrerer hochmolekularer Banden im β -Globulin- und IgG-Bereich, ferner schnell wandernder Banden rechts vom Albuminpeak.

Während also die Zahl der Proteine im Prostataexprimat und Spermaplasma bei Adnexitis deutlich zunimmt, verringert sich die Sekretion von Substanzen, deren Produktion von der Funktionsfähigkeit der Adnexdrüsen abhängt. Beispielsweise wird Zitronensäure bei Patienten mit Prostatitis und Epididymitis deutlich vermindert ins Spermaplasma abgegeben (SCHIRREN, 138).

Bei Prostatakarzinom ist offenbar ebenfalls die Abgabe von Proteinen ins Spermaplasma verringert. Bei einem Patienten mit Prostatakarzinom ließ sich durch die Elektrophorese des Prostataexprimates nur eine größere Proteinbande nachweisen, die im Zumischungsversuch als Albumin identifiziert werden konnte.

Dieser Befund weist auf die exkretorische Insuffizienz der karzinomatösen Prostata hin.

5.5. Androgenabhängigkeit der Spermaplasmaproteine

5.5.1. Antiandrogentherapie

Schließlich sollte noch die Androgenabhängigkeit des Proteinmusters im Spermaplasma untersucht werden. Bekannt ist, daß die sekretorische Aktivität der akzessorischen Geschlechtsdrüsen androgenabhängig ist. So konnte die Androgenabhängigkeit von Fructose, Phosphatase und Zitronensäure gezeigt werden (SCHILL, 122).

DORN (13) konnte bei der Elektrophorese von Spermaplasma zweier Patienten mit Androgenmangel erst durch Testosterongabe eine weitgehende Normalisierung der Spermaplasmaelektropherogramme herbeiführen. HERRMANN (37) berichtete erstmals über Eiweißverschiebungen im Spermaplasma von zwei Patienten mit sekundärem Hypogonadismus, die durch fast vollständiges Fehlen des von den Bläschendrüsen gebildeten spezifischen 3,72 S-Proteins charakterisiert waren. Bei einem Fall fanden sich zusätzlich eine hochgradige Verminderung von IgG und Lactoferrin sowie eine Vermehrung des spezifischen 1,1 S-Proteins aus der Prostata. Bei dem zweiten Fall wurde trotz mehrjähriger Hormonbehandlung neben dem Fehlen des 3,72 S-Proteins eine Verminderung der Proteinfraction B₁ nachgewiesen, während andere Proteine aus der Bläschendrüse normal oder sogar vermehrt waren. Aufgrund der Eiweißveränderungen im Spermaplasma wurde eine Unterfunktion der Prostata und der Bläschendrüse in beiden Fällen angenommen.

Diese Untersuchungen zeigen eindrucksvoll, daß das Proteinmuster des Spermaplasmas hormonabhängig ist. Das wird auch durch unsere eigenen Untersuchungen bestätigt.

Die Analyse des elektrophoretischen Proteinmusters vor und unter Antiandrogentherapie sowie nach Beendigung der Therapie mit 300 mg Cyproteronazetat i.m. alle zwei Wochen ergab, daß sich zwar Albumin unter Antiandrogentherapie nicht wesentlich

veränderte, die niedermolekularen Proteinbanden rechts vom Albumin unter Antiandrogenbehandlung dagegen außerordentlich stark abnahmen. Auch die Bande direkt links vom Albuminpeak nahm unter der Therapie deutlich ab. Nach Beendigung der Antiandrogenbehandlung zeigte sie wieder eine starke Zunahme, die möglicherweise auf eine überschießende Produktion nach vorhergehender Hemmung zurückzuführen ist.

Durch die Antiandrogentherapie nicht vermindert wurden einzelne schnell wandernde Banden, die ganz rechts im Densitogramm lagen. Sie nahmen sogar unter Antiandrogentherapie leicht zu, um nach Absetzen der Therapie wieder abzufallen.

Umgekehrt verhielten sich die niedermolekularen Proteine rechts vom Albumin, die nach Beendigung der Therapie eine deutliche Zunahme aufwiesen. Die beobachtete Einschränkung der Trennschärfe dürfte darauf zurückzuführen sein, daß infolge überschießender Produktion einzelner Proteine nach Therapiebeendigung eine Überlagerung mit anderen Proteinen in diesem Bereich stattfand.

Langzeitveränderungen nach Absetzen einer Cyproteronazetattherapie sind bei der Indikationsstellung zur Antiandrogenbehandlung zu berücksichtigen, wie etwa bei einem evt. Einsatz von Cyproteronazetat als männliches Kontrazeptivum (SCHILL, 121, 125). Bekannt ist, daß die Spermiogenese völlig reversibel ist (SCHILL, 125, OTT et al., 97, STÄDTLER und HORN, 150). Dagegen ist es fraglich, ob sich nach Absetzen der Antiandrogene die Leydigzellatrophie wieder zurückbildet (SCHILL, 125).

5.5.2. Gonadotropinsubstitutionstherapie

Bei der Substitutionstherapie des sekundären Hypogonadismus konnten entgegengesetzte Effekte im Proteinmuster des Spermaplasmas beobachtet werden. Infolge der fehlenden Androgenstimulation waren die Banden, die auf Antiandrogene mit einem Abfall reagierten, vor Therapie überhaupt nicht oder nur in Spuren vorhanden.

Unter Mesterolonthherapie traten vorher nicht nachweisbare nie-

dermolekulare Banden auf, die unter HMG/HCG-Substitution weiter zunahmen, während weitere niedermolekulare Banden hinzukamen, die denen entsprachen, die unter Antiandrogenezufuhr zunahmen. Ferner zeigte sich unter HMG/HCG-Therapie eine erhebliche Zunahme der als breite Schulter imponierenden Banden im hochmolekularen Bereich, die zu einer relativen Erniedrigung der Albuminfraktion führte.

Die vorliegenden Untersuchungen wiesen vor allem auf die Androgenabhängigkeit derjenigen Proteine hin, die aufgrund der Split-ejakulatetechnik dem Bläschendrüsensekret zugeordnet werden konnten. Die Sekretion der einzelnen Proteine ist offenbar unterschiedlich je nach Art der androgenen Stimulation, da die schnell wandernden Proteine (im Densitogramm ganz rechts lokalisiert) unter HMG/HCG- und auch Cyproteronazetatzufuhr zunahmen, unter Mesterolol aber nicht vermehrt waren. Die Zunahme dieser Proteine stellt wahrscheinlich einen direkten Effekt der HMG/HCG- bzw. Cyproteronazetatzufuhr dar.

6. ZUSAMMENFASSUNG

=====

Es wird über die Analyse von männlichen Genitalsekreten mit Hilfe von Mikro-Elektrophorese-Techniken berichtet, wobei die Elektrophoresetechnik ausführlich dargestellt wird.

Die verwendete Polyacrylamidgel-Elektrophorese ist bei einer Empfindlichkeit von 10^{-9} Gramm pro Einzelbande und gleicher Trennschärfe wie die bekannten Makromethoden besonders für die Analyse von Material geeignet, das nur in geringen Mengen zur Verfügung steht. Sie bietet außerdem den Vorteil, schnell Ergebnisse zu liefern, da bei entsprechender Ausrüstung des Labors schon knapp 60 Minuten nach Beginn der Elektrophorese die gefärbten und differenzierten Gele mit den geschriebenen Densitogrammen vorliegen können.

Über die Korrelation der Gelkonzentration homogener Polyacrylamidgele mit den Rf-Werten der aufgetrennten Proteinbanden

wurde für Blutserum und Spermaplasma als optimale Trennmethode die Polyacrylamidgel-Elektrophorese ermittelt. Sie arbeitet mit anionischer Diskontinuität und gleichmäßig ansteigender Gelkonzentration und wurde in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich verwendet.

Am Gradientengel korreliert die Wanderungstrecke einer Substanz umgekehrt exponentiell mit ihrem Molekulargewicht. Auf dieser Basis, sowie mit Hilfe von Zumischungsversuchen mit bekannten Proteinen wurden einzelne Proteinbanden im Spermaplasma und Prostataexprimat identifiziert: Albumin, Lactoferrin und Semin.

Bei dem Versuch, das elektrophoretische Bandenmuster klinisch zu verwerten fand sich keine klare Beziehung zwischen dem Elektrophoresebefund von Spermaplasma und pathologischen Spermogrammbefunden.

Prostataexprimat bei Prostatovesiculitis und Prostatakarzinom wurde untersucht, wobei ersteres zahlreiche Serumproteine enthielt und letzteres eine sekretorische Insuffizienz aufwies.

Ferner wurden Elektrophoresen von Hodengewebshomogenat nach Hodenbiopsie, Spermatozoenextrakt, Spermatozelenflüssigkeit, Sekret aus Ductus deferens und Bläschendrüsensekret durchgeführt.

Eine Zuordnung einzelner Proteinbanden zu den verschiedenen akzessorischen Genitaldrüsen war durch Spermaplasmauntersuchungen vor und nach Vasektomie und mit Hilfe der Split-ejakulatetechnik möglich. Ein hochmolekulares Protein im Spermaplasma fehlte nach Vasektomie und war in den Split-ejakulaten immer derjenigen Fraktion (I oder II) zuzuordnen, welche die meisten Spermatozoen enthielt. Sie ist offenbar spezifisch für das Hoden- /Nebenhodensekret. Eine analoge Bande, deren Identität mit der vorgenannten allerdings noch nicht erwiesen ist, zeigte sich im Hodenhomogenat und im Spermatozelenpunktat, war hingegen nicht im Sekret des Ductus deferens, des Prostataexprimates oder des Bläschendrüsensekretes nachzuweisen. Die zahlreichen niedermolekularen Banden, sowie eine breite Schul-

ter von Proteinbanden im hochmolekularen Bereich konnte mit Hilfe der Split ejakulatuntersuchungen dem Bläschendrüsensekret zugeordnet werden.

Die Androgenabhängigkeit des Proteinmusters des Spermaplasmas wurde bei Männern vor, während und nach Absetzen einer Antiandrogentherapie mit Cyproteronazetat, sowie bei sekundärem Hypogonadismus vor und während Substitutionstherapie mit Mesterolol und Humangonadotropinen untersucht. Bei ungenügender Androgenstimulation fehlten eine Reihe niedermolekularer Proteine im Spermaplasma, während sie unter physiologischen Androgenspiegeln und während der Therapie mit Mesterolol und Humangonadotropinen vorhanden waren. Einige schnell wandernde Banden nahmen dagegen sowohl unter Cyproteronazetat als auch unter Humangonadotropinsubstitution, nicht jedoch unter Mesterololgabe deutlich zu.

Die Erfahrungen zeigen, daß sich die Gradientengel-Elektrophorese im Mikromaßstab für die Analyse des Proteinmusters des Spermaplasmas und der einzelnen Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen eignet und daß sie für spezielle Fragestellungen der Andrologie von großem Nutzen sein kann.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S
=====

1. ALLEN, R.C., H.R. MAURER:
Electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel. Advances of methods and theories, biochemical and clinical applications.
Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York 1974
2. ALLEN, R.C., D.J. MOORE, R.H. DILWORTH:
New rapid electrophoresis procedure employing pulsed power in gradient gels at a continuous pH: The effect of various discontinuous buffer systems on esterase zymograms.
J. Histochem. Cytochem. 17, 189-197 (1969)
3. AMELAR, R.D., R.S. HOTCHKISS:
The split ejaculate. Its use in the management of male infertility.
Fertil. Steril. 16, 46-60 (1965)
4. BALBIERZ, H., Z. BORYZKO, M. NIKOLAJCZUK:
Changes occurring in proteins of bull semen-plasma owing to inflammatory condition of the efferent ducts.
Bull. Acad. pol. Sci. Ser. Sci. biol. 21, 841-863 (1973)
5. BISPINK, G.:
Persönliche Mitteilung 1976
6. BLENK, H., A. HOFSTETTER:
Quantitative Eiweißanalyse des Ejakulats.
Laborblätter 25, 166-173 (1975)
7. BRAUN-FALCO, O.:
Faktoren von seiten des Mannes - Einführung.
2. Fortbildungskurs der Bayerischen Landesärztekammer:
"Probleme der Sterilität in Praxis und Klinik" in München v. 8. - 12.11.1971

8. CATSIMPOOLAS, N.:
Immuno-electrofocusing electrophoresis.
Biochimica et Biophysica Acta 27, 365-366 (1970)
9. DAVAJAN, M.D., G.M. KUNITAKE:
Disc-electrophoretic and disc-gel Ouchterlony Analyses
of human genital fluids.
Fert. Ster. 19, 623-630 (1966)
10. DAVIS, B.J.:
Disc electrophoresis II, method and application to human serum proteins.
Ann. New York Acad. Sci. 121, 404-427 (1964)
11. DOCUMENTA GEIGY, 6. Auflage 1960
12. DOEPFNER, R., G. KRAMPITZ:
Die Aminosäuren im menschlichen Ejakulat.
Arch. klin. exp. Derm. 213, 751-756 (1961)
13. DORN, H.:
Elektrophorese des Spermaplasmas.
Arch. klin. exp. Derm. 213, 757-759 (1961)
14. ELIASSON, R.:
Analysis of semen.
Infertility, Vol. II, Eds. Behrman and Kistner 1974
15. ELIASSON, R., L. TREICHL:
Supravital staining of human spermatozoa.
Fertil. Steril. 22, 134-137 (1971)
16. ELIASSON, R., CHR. LINDHOLMER:
Distribution and properties of spermatozoa in different fractions of split ejaculates.
Fertil. Steril. 23, 252-256 (1972)

17. ELIASSON, R., C. LINDHOLMER:
Effect of human seminal plasma on sperm motility and survival.
Acta endocr. Copenh. 177, 60-76 (1973)
18. ELIASSON, R., O. JOHNSEN, C. LINDHOLMER:
Effects of seminal plasma on some functional properties of human spermatozoa.
Male Fertility and Sterility, Mancini R.E. and Marini L. 107-122 (1974)
19. Mc EWEN, B., H. HYDEN:
Study of specific brain proteins on the semi-micro scale.
J. Neurochem. 13, 823-833 (1966)
20. FARRIS, E.J., D.P. MURPHY:
The characteristics of the two parts of the partitioned ejaculate and the advantage of its use for intrauterine insemination.
Fertil. Steril. 11, 465-469 (1960)
21. FAWCETT, J.S.:
Isoelectric fractionation of proteins on polyacrylamidgels.
FEBS Letters, Vol. I - No. 1 (1968)
22. FELGENHAUER, K., S. BACH, A. STAMMLER:
Elektrophorese von Serum und Liquor cerebrospinalis in Polyacrylamidgel.
Klin. Wschr. 45, 371-377 (1967)
23. FELGENHAUER, K.:
Microelectrophoresis on polyacrylamidgel.
Biochim. Biophys. Acta 133, 165-167 (1967)
24. FELGENHAUER, K.:
Quantitation and specific detection methods after disc electrophoresis of serum proteins.
Clin. Chim. Acta 27, 305-312 (1970)

25. FELGENHAUER, K.:
Immunoglobulins in disc electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 29, 177-181 (1972)
26. FERGUSON, K.A.:
Starch-gel electrophoresis; - application to the classification of pituitary proteins and polypeptides.
Metabolism 13, 985-1002 (1964)
27. FRITZ, H., M. ARNHOLD, B. FÖRG-BREY, L.J.D. ZANEVELD, G.F.B. SCHUMACHER:
Verhalten der "Chymotrypsin-ähnlichen" Proteinase aus Humansperma gegenüber Protein-Proteinase-Inhibitoren.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1651-1653 (1972)
28. GARNER, D.L., M.H. EHLERS:
Effect of storage at 5°C on the disc electrophoretic patterns of ovine and bovine seminal proteins.
J. Reprod. Fert. 27, 43-52 (1971)
29. GARNER, D.L., G.W. SALISBURY, Ch.N. GRAVES:
Electrophoretic fractionation of bovine acrosomal proteins and proteinase.
Biology and Reproduction 4, 93-100 (1971)
30. GARNER, D.L., R.F. CULLISON:
Partial purification of bovine acrosin by affinity chromatography.
Journal of Chromatography 92, 445-449 (1974)
31. GOLDBLATT, M.W.:
Constituents of human seminal plasma.
Biochem. J. 29, 1346-1357 (1935)
32. GRAY, S., C. HUGGINS:
Electrophoretic analysis of human semen.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 50, 351-353 (1942)

33. GROSSBACH, U.:
Acrylamide gel electrophoresis in capillary columns.
Biochim. Biophys. Acta 107, 180-182 (1965)
34. HEDRICK, J.L., A.J. SMITH:
Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.
Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164 (1968)
35. HERMAN, G.:
Immunoelktrophoretische Untersuchungen am menschlichen Spermaplasma.
Clin. Chim. Acta 4, 116-123 (1959)
36. HERMAN, G.:
Le plasma seminal. In "Analyse Immunoelktrophoretique"
Eds. P. Grabar, P. Burtin, Masson, Paris 1960, S. 271
37. HERRMANN, W.P.:
Eiweißverschiebungen im Spermaplasma bei primärem und sekundärem Hypogonadismus.
Der Hautarzt, 8, 365-367 (1968)
38. HERRMANN, W.P. :
Enzymatisch aktive Proteine im menschlichen Spermaplasma.
Beiträge zur gerichtlichen Medizin 29, 175-180 (1972)
39. HERRMANN, W.P., G. HERMAN:
Immunoelktrophoretic and chromatographic demonstration of IgG, IgA and fragments of γ -Globulin in the human seminal fluid.
Int. J. Fert. 14, 211-215 (1969)
40. HERRMANN, W.P., G. HERMAN:
Chromatographische Fraktionierung und immunologische Analyse von menschlichem Spermaplasma.
Arch. klin. exp. Derm. 234, 100-116 (1969)

41. HJERTEN, S., S. JERSTEDT, A. TISELIUS:
Some aspects of the use of continuous and discontinuous buffer systems in polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 11, 219-223 (1965)
42. HOFFMEISTER, H., K.H. SCHÜTT:
Diagnostische Verwendbarkeit der Polyacrylamidgelelektrophorese. Dtsch. med. Wschr. 97, 1464-1466 (1972)
43. HORNSTEIN, O.P., N. HOFMANN:
Fertility and Sterility, Proc. 7th World Congress, Excerpta Medica, Amsterdam, S. 236-238 (1973)
44. HUGGINS, C.B., W. NEAL:
Coagulation and liquefaction of semen; proteolytic enzymes and citrate in prostatic fluid. J. Exp. Med. 76, 527-541 (1942)
45. HYDEN, H., K. BJURSTAM, B. Mc EWEN:
Protein separation at the cellular level by microdisc electrophoresis. Analyt. Biochem. 17, 1-15 (1966)
46. HYDEN, H., P.W. LANGE:
Micro-electrophoretic determination of protein and protein synthesis in the 10^{-9} to 10^{-7} gram range. J. Chromatogr. 35, 336-351 (1968)
47. INGRAM, L., M.P. TOMBS, A. HURST:
Mobility-molecular weight relationships of small proteins and peptides in acrylamide-gel electrophoresis. Anal. Biochem. 20, 24-29 (1967)
48. JECHT, E.W., Ch.H. POON:
Preparation of sperm-free seminal plasma from human semen. Fertil. Steril. 26, 1-5 (1975)

49. JOEL, Ch.A.:
Studien am menschlichen Sperma. B. Schwabe, Basel 1953
50. JOVIN, Th.M.:
Multiphasic zone electrophoresis I. - Steady-state moving-boundary systems formed by different electrolytic combinations. Biochemistry 12, 871-879 (1973)
51. JOVIN, Th.N.:
Multiphasic zone electrophoresis II. - Design of integrated discontinuous buffer systems for analytical and preparative fractionation. Biochemistry 12, 879-890 (1973)
52. JOVIN, Th.N.:
Multiphasic zone electrophoresis III. - Further Analysis and new forms of discontinuous buffer systems. Biochemistry 12, 890-898 (1973)
53. KALOGEROPOULOS, A., I. BONTIS, D. KESSIDIS, A. KYROU, D. VLACHOS, Th. EPIDIDIS, D. MAROUDIS:
The human sperm proteins in relation to the fertilization capacity. Referat 1970
54. KELLER, M., R. TSCHUMI:
Elektrophoretische Studien am menschlichem Spermaplasma. Gynaecologia, Basel 135, 92-95 (1953)
55. KIESSLING, W.:
Die klinische Bedeutung der Biochemie des Spermaplasmas. Arch. klin. exp. Derm. 213, 727-733 (1961)
56. KLOPSTOCK, A., R. HASS, A. RAMON:
Immunoelectrophoretic analysis of seminal plasma. Fertil. Steril. 14, 530-534 (1963)

57. KOHLRAUSCH, F.:
Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse
im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen.
Annalen der Physik und Chemie 62, 209-239 (1897)
58. KREYSZIG, E.:
Statistische Methoden und ihre Anwendung.
Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen, 3. Aufl. 1968
59. KRUSKI, A.W., K.A. NARAYAN:
Some quantitative aspects of disc electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 168, 570-572 (1968)
60. LAVON, U., J.C. BOURSNEILL:
Characterization of boar seminal plasma, vesicular se-
cretion and epididymal plasma proteins by gel disc elec-
trophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide.
J. Reprod. Fert. 27, 227-232 (1971)
61. LAVON, U., J.C. BOURSNEILL:
Split ejaculates of the boar: contributions of the epi-
didymides and seminal vesicles.
J. Reprod. Fert. 42, 541-552 (1975)
62. LAVON, U., P.A. BRIGGS, J.C. BOURSNEILL:
Further characterization of the proteins of boar semi-
nal plasma by isoelectric focusing on polyacrylamide.
J. Reprod. Fert. 30, 165-167 (1972)
63. LAVON, U., P.A. BRIGGS, J.C. BOURSNEILL:
Electrophoresis of protein fractions from boar seminal
plasma, vesicular secretion and epididymal plasma.
J. Reprod. Fert. 33, 39-51 (1973)
64. LEWIN, L.M., R. BEER, M. GLEZERMAN:
Electrophoretic separation of proteins on cellulose
acetate: a technique for the study of prostatic and
vesicular contributions in human seminal fluid.
Fertil. Steril. 25, 416-423 (1974)

65. LUNDQUIST, F.:
Studies on biochemistry of human semen; amino acids
and proteolytic anzymes.
Acta physiol. scandinav. 25, 178-187 (1951)
66. LUNDQUIST, F., T. THORSTEINSSON, O. BUUS:
Purification and properties of some enzymes in human
seminal plasma.
Biochem. J. 59, 69-79 (1955)
67. MacLEOD, J., R.S. HOTCHKISS:
The distribution of spermatozoa and of certain chemi-
cal constituents in the human ejaculate.
J. Urol. 48, 225-229 (1942)
68. MANN, T.:
The biochemistry of semen and of the male reproductive
tract.
Methuen, London 1964
69. MANN, T.:
Secretory function of the prostate, seminal vesicle
and other male accessory organs of reproduction.
J. Reprod. Fert. 37, 179-188 (1974)
70. MANN, T.:
Male reproductive system.
In "Handbook of Physiology" Sect. 7, Endocrinology 2,
461-471 (1975)
71. MARBERGER, E., H. MARBERGER:
Veränderungen des Ejakulates bei entzündlichen Erkran-
kungen der männlichen Adnexe.
Wiener Med. Wschr. 113, 153-156 (1963)
72. MAURER, H.R.:
Disc electrophoresis and related techniques of poly-
acrylamide gel electrophoresis.
Walter de Gruyter, Berlin, New York 1971

73. MAURER, H.R., R.C. ALLEN:
Usefull buffer and gel systems for polyacrylamide gel electrophoresis.
Z. Klin. Chem. u. klin. Biochem. 10, 220-225 (1972)
74. MESECKE, S.:
Persönliche Mitteilung 1976
75. MISCHLER, T.W., E.P. REINEKE:
Some electrophoretic and immunological properties of human semen.
J. Reprod. Fert. 12, 125-129 (1966)
76. MITTENECKER, E.:
Planung und statistische Auswertung von Experimenten.
Franz Deuticke, Wien 1968
77. MOGHISSI, K.S., F.N. SYNER:
The effect of seminal protease on sperm migration through cervical mucus.
Int. J. Fertil. 15, 43-49 (1970)
78. NEUHOFF, V.:
Micro-Disc-Elektrophorese von Hirnproteinen.
Arzneimittelforschung - drug research 18, 35-39 (1968)
79. NEUHOFF, V.:
Simplified technique of high-speed capillary centrifugation.
Anal. Biochem. 23, 359-362 (1968)
80. NEUHOFF, V.:
Einfaches Verfahren zur hochtourigen Kapillazentrifugation.
"G-I-T" Fachzeitschrift für das Laboratorium Heft 2,
S. 86-87 (Febr. 1969)
81. NEUHOFF, V.:
Die Disk-Elektrophorese als analytische Mikromethode zur Charakterisierung von Makromolekülen.
Mitteilungen d. Dtsch. Pharmaz. Ges. 40, 289-314 (1970)

82. NEUHOFF, V.:
Manual 1. EMBO-Course on micromethods in molecular biology. Max-Planck-Gesellschaft, Dokumentationsstelle Göttingen 1970
83. NEUHOFF, V.:
Micromethods in molecular biology.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1973
84. NEUHOFF, V., W.-B. SCHILL:
Kombinierte Mikro-Disk-Elektrophorese und Mikro-Immunpräzipitation von Proteinen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 795-800 (1968)
85. NEUHOFF, V., A. LEZIUS:
Nachweis und Charakterisierung von DNS-Polymerasen durch Micro-Disc-Elektrophorese.
Zeitschrift f. Naturforschung, 23b, 812-819 (1968)
86. NEUHOFF, V., B. MÜHLBERG, J. MEIER:
Strom- und spannungskonstantes Netzgerät für die Micro-Disc-Elektrophorese.
Arzneimittelforschung - drug research, 17, 649-651 (1967)
87. NEUHOFF, V., W.-B. SCHILL, D. JACHERTS:
Nachweis einer RNA-abhängigen RNA-Replicase aus immunologisch kompetenten Zellen durch Mikro-Disk-Elektrophorese.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 157-162 (1970)
88. NEUHOFF, V., W.-B. SCHILL, H. STERNBACH:
Micro-analysis of pure deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase from Escherichia coli.
Biochem. J. 117, 623-631 (1970)
89. NEUHOFF, V., W.-B. SCHILL, H. STERNBACH:
Mikro-Disk-elektrophoretische Analyse reiner DNA-abhängiger RNA-Polymerase aus E. Coli. -II.
Arzneimittelforschung - drug research 19, 336-339 (1969)

90. NEUHOFF, V., W.-B. SCHILL, H. STERNBACH:
Mikro-Disk-elektrophoretische Analyse reiner DNA-abhängiger RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*. -III. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 335-340 (1969)
91. NEUHOFF, V., W.-B. SCHILL, H. STERNBACH:
Mikro-Disk-elektrophoretische Analyse reiner DNA-abhängiger RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*. -IV. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 767-774 (1969)
92. NIERMANN, H.:
Bestimmung der Citronensäure bei Männern mit Fertilitätsstörungen. Arch. klin. exp. Derm. 213, 744-746 (1961)
93. NIKOLOWSKI, W.:
Die klinische Bedeutung der Biochemie des Spermaplasmas. Arch. klin. exp. Derm. 213, 720-726 (1961)
94. NOVOTNY, G.E.K.:
Untersuchung der Proteinbeschaffenheit funktioneller Systeme des Zentralnervensystems und deren Veränderungen durch experimentelle Eingriffe. Sonderforschungsbereich 33 - Nervensystem und biologische Information, Göttingen S. 247-280, 1972
95. van ORDEN, D.E.:
A Technique for Microimmunoelectrophoresis in acrylamide gels. Immunochemistry 5, 497-499 (1968)
96. ORNSTEIN, L.:
Disc-Electrophoresis I - Background and Theory. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321-349 (1964)
97. OTT, F., H. HOFFET, H. HODEL:
Über die Erholung der Spermiogenese nach Behandlung mit Cyproteronacetat. Schweiz. med. Wschr. 102, 1124-1126 (1972)

98. PASTEWKA, J.V., A.T. NESS, A.C. PEACOCK:
Electrophoretic patterns of normal human serums by disc electrophoresis in polyacrylamide gel. Clin. Chim. Acta 14, 219-226 (1966)
99. PEACOCK, A.C., S.L. BUNTING, K.G. QUEEN:
Serum protein electrophoresis in acrylamide gel: patterns from normal human subjects. Science 147, 1451-1453 (1965)
100. PETZOLD, U., W. DAMES, G.H.M. GOTTSCHESKI, V. NEUHOFF:
Das Proteinmuster in frühen Entwicklungsstadien des Kaninchens. Cytobiologie 5, 272-280 (1972)
101. POULIK, M.D.:
Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature 180, 1477-1484 (1957)
102. PUN, J.Y., K. LOMBROZO:
Microelectrophoresis of brain and pineal protein in polyacrylamide gel. Analyt. Biochem. 2, 9-20 (1964)
103. QUINLIVAN, W.L.G.:
Analysis of the proteins in human seminal plasma. Archives of Biochem. and Biophys. 127, 680-687 (1968)
104. RABACH, J.:
Electrophoresis of seminal plasma proteins. Int. J. Fertil. 6, 31-35 (1961)
105. RAYMOND, S., M. NAKAMICHI:
Electrophoresis in synthetic gels. II: Effect of gel concentration. Anal. Biochem. 7, 225-232 (1964)

106. RAYMOND, S., L. WEINTRAUB:
Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis.
Science 130, 711-722 (1959)
107. RICHTERICH, R.: Enzymopathologie
Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg
605-634 (1958)
108. RICHTER-LANDSBERG, C.:
Isolierung und Charakterisierung der Membranproteine synaptischer Vesikel.
Inaugural-Dissertation Göttingen 1975
109. RICK, W.:
Chymotrypsin.
In "Methoden der enzymatischen Analyse", Bergmeyer,
Bd. 1, Verlag Chemie, Weinheim 1970
110. ROA, S.A., K.K. SADRI:
Immunological studies with human semen and cervical mucus.
Fertil. Steril. 11, 329-335 (1960)
111. RODBARD, D., A. CHRAMBACH:
Quantitative polyacrylamide gel electrophoresis: mathematical and statistical analysis of data.
In "Electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel." Eds. R.C. Allen, H.R. Maurer.
Walter de Gruyter Berlin, New York S. 28-62, 1974
112. RODBARD, D., A. CHRAMBACH, G.H. WEISS:
Optimization of resolution in analytical and preparative polyacrylamide gel electrophoresis.
In "Electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel." Eds. R.C. Allen, H.R. Maurer, S. 62-105.
Walter de Gruyter Berlin, New York 1974

113. ROSS, V., D.H. MOORE, E.G. MILLER:
Proteins of human seminal plasma.
J. Biol. Chem. 144, 667-677 (1942)
114. ROZIN, S., E. GRAFF, E. SHAFRIR:
Electrophoretic resolution and characterization of human seminal plasma proteins.
Int. J. Fertil. 8, 523-530 (1963)
115. RÜCHEL, R.:
Persönliche Mitteilung 1976
116. RÜCHEL, R., M.D. BRAGER:
Scanning electron microscopic observations of polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 68, 415-428 (1975)
117. RÜCHEL, R., S. MESECKE, D.I. WOLFRUM, V. NEUHOFF:
Mikroelektrophorese an kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengelen, I: Herstellung und Eigenschaften von Gelgradienten in Kapillaren; ihre Anwendung zu Proteinfraktionierung und Molekulargewichtsbestimmung.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1351-1368 (1973)
118. RÜCHEL, R., S. MESECKE, D.I. WOLFRUM, V. NEUHOFF:
Micro-electrophoresis in continuous-polyacrylamide-gradient gels, II: Fractionation and dissociation of sodium dodecylsulfate protein complexes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 997-1020 (1974)
119. RÜCHEL, R., C. RICHTER-LANDSBERG, V. NEUHOFF:
Mikroelektrophorese in kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengelen, IV: Der Einfluß von Reduktionsmitteln auf die Proteinelektrophorese in Dodecylsulfat-Puffersystemen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1283-1288 (1975)
120. SCHILL, W.-B.:
Acrosin-activity in human spermatozoa: methodological investigations.
Derm. Forschung 248, 257-273 (1973)

121. SCHILL, W.-B.:
Tagungsbericht der internationalen Konferenz: "The human semen and fertility regulation in the male" v. 24.-25.4.75 in Detroit - USA.
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 35, 721-724 (1975)
122. SCHILL, W.-B.:
Biochemie des Spermaplasmas und seine Aussagekraft.
Vortrag zur 7. Diagnostikwoche Düsseldorf v. 19.-23.11.75
123. SCHILL, W.-B.:
Die Bedeutung proteolytischer Spermaenzyme für die Fertilität.
Der Hautarzt 26, 514-523 (1975)
124. SCHILL, W.-B.:
Moderne Aspekte der andrologischen Therapie.
Therapiewoche - Wochenschrift für praktische Medizin 25, 2762-2769 (1975)
125. SCHILL, W.-B.:
Gibt es zur Zeit eine medikamentöse Antikonzeption beim Mann?
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 35, 504-511 (1975)
126. SCHILL, W.-B.:
Acrosin activity of cryo-preserved spermatozoa.
Fertil. Steril. 26, 711-719 (1975)
127. SCHILL, W.-B.:
Lokalisation der akrosomalen Proteinase und ihrer Inhibitoren.
Fortschritte der Medizin 93, 1492 (1975)
128. SCHILL, W.-B.:
Die Bedeutung der Proteasen des männlichen Genitaltraktes für die Fortpflanzung.
Med. Welt 26, 1450-1453 (1975)

129. SCHILL, W.-B.:
Increased fructolysis of kallikrein-stimulated human spermatozoa.
Andrologia 7, 105-107 (1975)
130. SCHILL, W.-B.:
Stimulation of sperm motility by kinins in fresh and 24 hours aged human ejaculates.
Andrologia 7, 135-139 (1975)
131. SCHILL, W.-B.:
Caffeine- and kallikrein-induced stimulation of human sperm motility: a comparative study.
Andrologia 7, 229-236 (1975)
132. SCHILL, W.-B.: Improvement of sperm motility in patients with asthenozoospermia by kallikrein treatment.
Int. J. Fert. 20, 61-63 (1975)
133. SCHILL, W.-B.:
Erste Ergebnisse der Behandlung von männlichen Fertilitätsstörungen mit Kallikrein: Asthenozoospermie.
Der Hautarzt 26, 430-432 (1975)
134. SCHILL, W.-B.:
Erste Ergebnisse einer parenteralen Behandlung von männlichen Fertilitätsstörungen mit Kallikrein: Oligozoospermie.
Der Hautarzt 26, 541-542 (1975)
135. SCHILL, W.-B.:
Wirkung von verschiedenen Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Spermatozoen-Motilität in vitro.
Klin. Wschr. 53, 73-79 (1975)
136. SCHILL, W.-B., N. HEIMBURGER, H. SCHIESSLER, R. STOLLA, H. FRITZ:
Reversible attachment and localization of the acid-stable seminal plasma acrosin-trypsin inhibitors on boar spermatozoa as revealed by the indirect immunofluorescent staining technique.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1473-1476 (1975)

137. SCHILL, W.-B., H. SCHIESSLER, V. WENDT, N. HEIMBURGER, H. FRITZ:
Localization of low molecular weight acrosin-trypsin inhibitors in the boar genital tract by immunofluorescence.
Andrologia 8, 29-36 (1976)
138. SCHIRREN, C.:
Inosit und Citronensäure im Spermaplasma.
Arch. klin. exp. Derm. 213, 740-744 und 764 (1961)
139. SCHIRREN, C.:
Fertilitätsstörungen des Mannes.
Enke Verlag, Stuttgart 1961
140. SCHIRREN, C.:
Praktische Andrologie
Brüder Hartmann, Berlin 1971
141. SCHLEUNING, W.-D., R. HELL, H. SCHIESSLER, H. FRITZ:
Boar acrosin I - Modified isolation procedure, active-site titration and evidence for the presence of sialic acid.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1915-1921 (1975)
142. SCHLEUNING, W.-D., R. HELL, H. FRITZ:
Multiple forms of boar acrosin and their relationship to proenzyme activation.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 207-212 (1976)
143. SCHLEUNING, W.-D., R. HELL, H. FRITZ:
Multiple forms of human acrosin: isolation and properties.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 855-865 (1976)
144. SCHNEIDER, W., K. NOWAKOWSKI, K.D. BOIGT:
Die Papierelektrophorese von menschlichem Spermaplasma.
Klin. Wschr. 32, 863-867 (1954)
145. SEARCY, R.L., R.G. CRAIG, L.M. BERQUIST:
Immunochemical properties of normal and pathologic seminal plasma.
Fertil. Steril. 15, 1-8 (1964)

146. SHAPIRO, A.L., E. VINUELA, J.V. MAIZEL:
Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. and Biophys. Research Communications 28, 815-820 (1967)
147. SIEPMANN, R., H. STEGEMANN:
Enzym-Elektrophorese in Einschlußpolymerisaten des Acrylamids - A) Amylasen, Phosphorylasen.
Zeitschrift für Naturforschung 22b, 949-955 (1967)
148. SMITHIES, O.:
Molecular size and starch-gel electrophoresis.
Arch. biochem. biophys. 1, 125-131 (1962)
149. SPRINZL, M., D.I. WOLFRUM, V. NEUHOF:
Separation of aminoacyl-tRNA(Phe) and tRNAs(Phe) with partially hydrolysed 3'-end by polyacrylamide gradient micro-electrophoresis.
FEBS-Letters 50, 54-56 (1975)
150. STÄDTLER, F., H.J. HORN:
Veränderungen am menschlichen Hoden während einer Anti-androgen-Behandlung.
Dtsch. med. Wschr. 98, 1013-1019 (1973)
151. STEGEMANN, H.:
Enzym-Elektrophorese in Einschluß-Polymerisaten des Acrylamids - B) Polygalakturonasen (Pektinasen).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 951-952 (1967)
152. SUOMINEN, J.:
The purification and new properties of the neutral proteinase in human semen.
Int. J. Fertil. 19, 121-128 (1974)
153. SUOMINEN, J., M. NIEMI:
Proteolytic enzymes in human seminal fluid.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 25, 52-57 (1970)

154. SUOMINEN, J., R. ELIASSON, M. NIEMI:
The relation of the proteolytic activity of human seminal plasma to various semen characteristics.
J. Reprod. Fert. 27, 153-156 (1971)
155. SYNER, F.N., K.S. MOGHISSI:
Pathways to Conception.
Ed. A.I. Sherman, - Charles C. Thomas, Springfield 1971
156. SYNER, F.N., S.K. MOGHISSI:
Purification and properties of a human seminal proteinase.
Biochem. J. 126, 1135-1140 (1972)
157. TAUBER, P.F., L.J.D. ZANEVELD, D. PROPPING, G.F.B. SCHUMACHER:
Components of human split ejaculates I - Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, lactoferrin, transferrin and other plasma proteins.
J. Reprod. Fert. 43, 249-267 (1975)
158. TAUBER, P.F., L.J.D. ZANEVELD, D. PROPPING, G.F.B. SCHUMACHER:
Components of human split ejaculates II - Enzymes and proteinase inhibitors.
J. Reprod. Fert. 46, 165-171 (1976)
159. THORUN, W.:
Der Molekularsiebeffekt bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese als Funktion von Molekülgröße, Gelkonzentration und Gelvernetzung sowie seine Anwendung zur Molekulargewichtsbestimmung.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 2, 3-12 (1971)
160. TOMBS, M.P.:
The interpretation of gel electrophoresis.
Anal. Biochem. 13, 121-132 (1965)
161. WARDI, A.H., G.A. MICHOS:
Alcian blue staining of glycoproteins in acrylamide disc electrophoresis.
Analyt. Biochem. 49, 607-609 (1972)

162. WEIL, A.J., O. KATSEVOLOV, L. WILSON:
Antigens of human seminal plasma.
Prod. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 606-610 (1956)
163. WENDT, V., W. LEIDL, W.-B. SCHILL:
Methodische Untersuchungen zur Gelatinolyse durch Spermien.
In "Fortschritte der Fertilitätsforschung III": "Fortschritte der Andrologie", Band 5, S. 181-188.
Ed. C. Schirren, Grosse-Verlag, Berlin 1975
164. WENDT, V., W. LEIDL, H. FRITZ:
The lysis effect of bull spermatozoa on gelatin substrat film - methodological investigations.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 315-323 (1975)
165. WHITE, M.L., G.H. DORION:
Diffusion in a crosslinked acrylamide polymer gel.
J. Polymer Sci. 55, 731-740 (1961)
166. WOLFF, H., W.-B. SCHILL, P. MORITZ:
Rundköpfige Spermatozoen: Ein seltener andrologischer Befund (Kugelhäuferspermatozoen, Globozoospermie).
Der Hautarzt 27, 111-116 (1976)
167. WOLFRUM, D.I.:
Einfache Ausrüstung zur Mikroelektrophorese in Polyacrylamidgelen.
G-I-T Fachz. Lab. 18, 1098-1100 (1974)
168. WOLFRUM, D.I., R. RÜCHEL, S. MESECKE, V. NEUHOFF:
Mikroelektrophorese in kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengelen III: Extraktion und Fraktionierung von Ribonucleinsäuren im Mikromaßstab.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1415-1435 (1974)
169. ZANEVELD, L.J.D., G.F.B. SCHUMACHER, P.F. TAUBER, D. PROPPING:
Proteinase inhibitors and proteinases of human semen.
In "Proteinase Inhibitors," Eds. H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene and L.E. Truscheit.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 136-146
1974

Herrn Prof. Dr. med. O. Braun-Falco danke ich für die Möglichkeit, in seiner Klinik zu arbeiten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. W.-B. Schill gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und seine wertvolle Unterstützung durch Anleitung und Diskussionen.

Herzlich danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. P. Dörmer für die freundliche Erlaubnis, in seinen Institutsräumen das Joyce Loebel Mikrodensitometer zu benutzen, sowie Herrn Riedel für die Unterweisung am Acetylenbrenner und die Möglichkeit, in der Werkstatt der Dermatologischen Klinik zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. V. Neuhoff, Herrn Dr. G. Bispink und Frau S. Mesecke danke ich für die technischen Ratschläge und Diskussionen.

Für die Überlassung von Präparaten danke ich Herrn Prof. Dr. med. A. Hofstetter, Herrn Prof. Dr. med. E. Elsässer und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. P. Carl.

Herrn Dr. I. Wiederholt möchte ich meinen Dank aussprechen für die Hilfe bei der Gewinnung von Patienten für die Antiandrogentherapie.

Schließlich gilt mein besonderer Dank Herrn Bilek, der mich bei der fotografischen Arbeit mit Rat und Tat unterstützte.

L E B E N S L A U F
=====

Am 06.10.50 wurde ich als zweites Kind von Robert Perwein und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Fretter, in München geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit kam ich 1961 ins Gymnasium und schloß nach weiteren neun Jahren 1970 meine humanistische Ausbildung am Ludwigsgymnasium München mit dem Abitur ab.

Im Wintersemester 70/71 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mein Medizinstudium. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich nach zwei Semestern, die ärztliche Vorprüfung entsprechend der Bestallungsordnung für Ärzte nach dem fünften Semester ab.

Vom Beginn meines Studiums an war ich Stipendiat der Bayerischen Begabtenförderung und seit April 72 des Cusanuswerkes. Meine Dissertation begann ich 1975 bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. W.-B. Schill.

Im Wintersemester 76/77 schloß ich mein Studium mit der ärztlichen Prüfung ab.

Im April 77 heiratete ich Frl. Angelika Dorschner.

Meine einjährige Medizinalassistentenzeit leistete ich zu je einem Drittel in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor Prof. Dr. O. Braun-Falco), in der I. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern bei Herrn Prof. Dr. Riecker und in der chirurgischen Klinik Dr. Rinecker.

Die Approbation als Arzt erhielt ich im März 1978 und war danach fünfzehn Monate lang als wehrpflichtiger Stabsarzt in der Sanitätsakademie der Bundeswehr als Hörsaalleiter und Ausbilder tätig.

Jetzt bin ich als Assistenzarzt in der Dermatologischen und Allergologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München Schwabing, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität München beschäftigt.

