

Aus dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW)
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

***Die Wirkung antimikrobieller Peptide (AMP) bei der
Konservierung von Ebersperma***

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Martin Schulze
Tierarzt aus Hennigsdorf

Berlin 2009
Journal-Nr.: 3390

**Die Arbeit wurde durch Mittel der
Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AIF),
Geschäftsstelle Berlin gefördert.**

**Kooperationspartner:
Biosyntan, Berlin
Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin
Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW), Berlin**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Heribert Hofer
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dagmar Waberski
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
artificial insemination, boars, peptides, antimicrobial properties

Tag der Promotion: 13.08.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-826-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen
daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner
Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet
werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne
besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und
Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of
the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinem Sohn Leo Carlos und meiner Frau Yesica Magali gewidmet.

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Bakterielle Kontamination des Eberspermas	2
2.2	Bedeutung einer bakteriellen Kontamination	3
2.3	Resistenzsituation	4
2.4	Antimikrobielle Peptide	5
2.4.1	Klassifikation und Wirkungsmechanismen der antimikrobiellen Peptide	5
2.4.2	Antimikrobielle Peptide in der Reproduktionsbiologie	7
2.4.2.1	Spermizid wirkende antimikrobielle Peptide	7
2.4.2.2	Befruchtungsrelevante antimikrobielle Peptide und Proteine	7
2.4.3	Die zyklischen Hexapeptide c-RRWWWR und c-RRWFWR	9
2.4.4	Die helikalen Magainin-Derivate MK5E und IVWTI-M2a	10
2.4.5	Resistenzen gegen antimikrobielle Peptide	11
2.4.6	Synergiemechanismen	12
3	Material und Methoden	14
3.1	Peptidmaterial	14
3.2	Versuchsaufbau	14
3.3	Akrosomenmorphologie	16
3.4	pH-Wert-Messung	17
3.5	Computerassistierte Spermienmotilitätsanalyse (CASA)	17
3.6	Durchflusszytometrische Untersuchung	19
3.6.1	Übersicht der eingesetzten Fluorochrome	19
3.6.2	Durchführung und Auswertung der Messung	21
3.7	Mikrobiologische Untersuchung	23
3.8	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	24
3.9	Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR)	25
3.9.1	Phospholipidanaloga	25
3.9.2	Messung der ESR-Spektren	25
3.9.3	Bestimmung der Korrelationszeit (τ_c)	26
3.10	Statistische Auswertung	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Effekt einer AMP-Supplementierung gegenüber Gentamicin im Verlauf der Lagerung (Versuch A)	28
4.1.1	Auswirkungen eines Peptidzusatzes auf den pH-Wert des Verdünners	28
4.1.2	Auswirkungen eines Peptidzusatzes auf den Akrosom- und Membranstatus	29

4.1.3	Auswirkungen eines Peptidzusatzes auf die Spermienmotilität	31
4.1.4	Bestimmung der Lebendkeimzahl nach Zusatz verschiedener Peptide	38
4.1.5	Untersuchungen des Keimspektrums nach Zusatz verschiedener Peptide	39
4.1.6	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) an ausgewählten Bakterienstämmen	40
4.2	Effekt einer AMP-Supplementierung auf die Spermienmotilität in Abhängigkeit von der Konzentration (Versuch B)	41
4.3	Effekt einer Supplementierung von AMP und Gentamicin im Verlauf der Lagerung (Versuch C)	44
4.3.1	Auswirkungen der Kombination aus Peptid und reduzierter Gentamicinkonzentration auf den pH-Wert des Verdünners	45
4.3.2	Auswirkungen der Kombination aus Peptid und reduzierter Gentamicinkonzentration auf den Akrosom-, Membran- und Mitochondrienstatus	45
4.3.3	Auswirkungen der Kombination aus Peptid und reduzierter Gentamicinkonzentration auf die Spermienmotilität	46
4.3.4	Untersuchungen des Keimspektrums nach Zusatz verschiedener Peptide und reduzierter Gentamicinkonzentration	49
4.3.5	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) an ausgewählten Bakterienstämmen nach Zusatz verschiedener Peptide und reduzierter Gentamicinkonzentration	51
4.4	Bindungsstudien carboxyfluoreszeinmarkierter Peptide an Eberspermien	52
4.5	Charakterisierung der Wechselwirkung von Peptiden mit der Spermienzellmembran	53
5	Diskussion	57
5.1	Auswirkungen verschiedener Peptide auf die Spermaqualität	58
5.2	Antimikrobielle Wirksamkeit verschiedener Peptide	61
5.3	Abschließende Bewertung und Ausblick	63
6	Zusammenfassung	65
7	Summary	66
8	Literaturverzeichnis	67
9	Vorträge mit publizierten Kurzfassungen	87
10	Danksagung	88
11	Eidesstattliche Erklärung	89

Abkürzungsverzeichnis

äAM	äußere Akrosomenmembran
AMP	antimikrobielle Peptide
BTS	Beltswille Thawing Solution
CASA	computerassistierte Spermienmotilitätsanalyse
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Institute
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
DIC	differentieller Interferenzkontrast
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FLUO	Carboxyfluorescein
IWWTI-M2a	Aminosäuresequenz GIGKF IHSV KKWGKT FIGEI MNS-NH2
KbE	Kolonie bildende Einheiten
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
M2a-[F]	[Fluo]-Magainin-2-amid
MHIIB	Mueller-Hinton-II-Bouillon
MIC	minimal inhibitory concentration; minimale Hemmkonzentration
MK5E	Aminosäuresequenz GIGKF IHAVK KKWGKT FIGEI AKS-NH2
NAR	Normaler Apikaler Rand
OD	Optische Dichte
PAS	particle analysing system
PI	Propidiumjodid
PNA	peanut agglutinin
pNaCl	phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PSA	<i>Pisum sativum</i> Agglutinin
Q1-4	Quadrant 1 bis 4
R123	Rhodamin-123
SL-PC	1-Palmitoyl-2-(4-doxylpentanoyl)phosphatidylcholin
SL-PS	1-Palmitoyl-2-(4-doxylpentanoyl)phosphatidylserin
SL-SM	N-(4-doxylpentanoyl)-trans-sphingeny-1-phosphocholin
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiozyanat
TRT	Thermoresistenztest
WFW	Aminosäuresequenz c(RRWFWR)
WW[F]	Aminosäuresequenz c(RRRWWK[FLUO])
WWW	Aminosäuresequenz c(RRWWWR)
WWW[F]	Aminosäuresequenz c(RRWWWK[FLUO])

Motilitätsparameter

ALH - amplitude of lateral head displacement - Amplitude der Kopfauslenkung	[μm]
AOC - average orientation change of the head - Auslenkungswinkel	[Grad]
BCF - beat cross frequency - Kopfauslenkungen s^{-1}	[Hz]
DAP - distance average path - gemittelte Bahn	[μm]
DCL - distance curved line - tatsächlich zurückgelegte Strecke	[μm]
DSL - distance straight line - linearisierte zurückgelegte Strecke	[μm]
HYPER - Anteil hyperaktiv beweglicher Spermien	[%]
IMMOT - Anteil unbeweglicher Spermien	[%]
LIN - linearity - Linearität (Quotient aus VSL/VCL)	
LIN P - Anteil geradlinig beweglicher Spermien	[%]
MOT P - Anteil motiler Spermien	[%]
PROG ALH - seitliche Kopfauslenkung progressiv motiler Spermien	[μm]
PROG BCF - durchschnittliche Schlagfrequenz (s^{-1}) progressiv motiler Spermien	[Hz]
PROG DAP - gemittelte Bahn progressiv motiler Spermien	[μm]
PROG LIN - Linearität progressiv motiler Spermien (Quotient aus PROG VSL/PROG VCL)	
PROG P - Anteil progressiv motiler Spermien	[%]
PROG VAP - durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeit progressiv motiler Spermien	[$\mu\text{m s}^{-1}$]
VAP - velocity average path - Geschwindigkeit der geglätteten Bahn	[$\mu\text{m s}^{-1}$]
VCL - velocity curved line - Spurgeschwindigkeit	[$\mu\text{m s}^{-1}$]
VSL - velocity straight line - Geschwindigkeit der linearen Strecke	[$\mu\text{m s}^{-1}$]

Einbuchstabencode der Aminosäuren

E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften entdeckt [39, 412]. Diese so genannten „*host defence*“-Peptide spielen eine entscheidende Rolle in der immunologischen Abwehr und wurden erstmalig durch Boman und Steiner (1981) in Studien zum Immunsystem der Motte *Hyalophora cecropia* beschrieben [41, 166, 398, 399]. Antimikrobielle Peptide (AMP) wirken gegen eine Vielzahl von Pathogenen und beeindrucken durch ihre Multifunktionalität [40, 48, 126, 175, 298, 407]. Neben ihrer antimikrobiellen Aktivität sind einige Peptide an der Zellproliferation, der Wundheilung, der Angiogenese und der akuten Entzündungsreaktion beteiligt. In Säugerorganismen werden AMP insbesondere im Epithelgewebe der Haut, im Verdauungstrakt, in den Atmungsorganen und im Reproduktionstrakt als unmittelbare Antwort auf einen mikrobiellen Befall synthetisiert [155, 168, 214, 248, 315].

Mit der wachsenden Resistenz von Bakterien gegenüber konventionellen Antibiotika gab es in den letzten Jahrzehnten verstärkt Bestrebungen, AMP als Wirkstoffe für den klinischen Einsatz zu entwickeln [3, 104, 110, 119, 125, 128, 132, 134, 156, 170, 171, 194, 211, 234, 240, 258, 271, 272, 332]. Erfolgreich waren in der Mehrzahl topische Anwendungen. Auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin wurden die Entwicklungsbemühungen bisher auf eine Behandlung von venerischen Krankheitsbildern und auf die Kontrazeption fokussiert [61, 291, 292, 296, 417].

Antimikrobielle Wirkstoffe sind für die Flüssigkonservierung von Sperma landwirtschaftlicher Nutztieren von großer Bedeutung [49]. Aufgrund der rasanten und weltweiten Entwicklung von Antibiotikaresistenzen im verdünnten Sperma besteht auch hier die Notwendigkeit, Alternativen zu konventionellen Antibiotika zu entwickeln [8]. Eine erfolgreiche Anwendung antimikrobieller, synthetischer Peptide als Verdünnungszusatz wäre ein Novum beim Reproduktionsmanagement von Nutztieren [7, 187, 188].

Ziel dieser Arbeit war es, in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP, Berlin), der Gesellschaft für Bioorganische Synthese (Fa. Biosyntan, Berlin) und dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW, Berlin) einen Peptidwirkstoff zu etablieren, der zu einer Konsolidierung der Konservierung von Ebersperma durch Substitution oder Reduktion der Konzentration praxisüblicher Antibiotika beiträgt. Zu den Leistungsanforderungen antibiotischer Verdünnungszusätze gehören im Wesentlichen optimale Keimhemmung [8], geringe Zytotoxizität [338], hohe Stabilität [153], Vermeidung von Fertilitätsverlusten [342] und Wirtschaftlichkeit [153, 335].

Die vorliegende Arbeit dokumentiert Versuche, in denen synthetische, antimikrobielle Peptide zur Flüssigkonservierung von Eberspermien getestet wurden. In Vorarbeiten am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie wurden aus einem Spektrum von über 40 synthetischen Verbindungen mit Hilfe von Struktur-Wirkungs-Analysen vier Peptidvarianten dafür ausgewählt, darunter zwei zyklische Hexapeptide und zwei helikale Magainin-Derivate. Kriterien, die die Peptide bei der Konservierung erfüllen sollten, waren eine hohe antimikrobielle Aktivität im mikromolaren Konzentrationsbereich und ein moderates Hämolyseverhalten. Die minimalen inhibitorischen Konzentrationen wurden für einzelne Peptide an den Laborstämmen *Escherichia (E.) coli* DH-5 α und *Bacillus (B.) subtilis* DSM 347 vorab bestimmt und dem Einsatz im Verdünnungszusatz zu Grunde gelegt.

Die konservierten Ejakulate wurden spermatologisch und mikrobiologisch untersucht. Zur Charakterisierung der Wirkung der Peptide auf Spermienzellen wurden eine morphologische Beurteilung der Akrosomen und eine computerassistierte Spermienmotilitätsanalyse durchgeführt. Weiterhin wurden die Durchflusszytometrie, die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und die Elektronenspinresonanzspektroskopie genutzt, um die Wirkung der AMP auf Spermienzellmembranen zu analysieren. Die mikrobiologische Untersuchung umfasste eine Analyse des quantitativen und qualitativen Keimspektrums der verdünnten Ejakulate sowie eine Prüfung der Resistenz ausgewählter Keime gegen die Peptide.

2 Literaturübersicht

2.1 Bakterielle Kontamination des Eberspermas

Die künstliche Besamung ist die Grundlage der industriellen Schweineproduktion [304]. Mit ihrer Einführung wurde die horizontale und vertikale Übertragung von Keimen deutlich vermindert [86, 190, 222, 300, 351]. Obwohl Spermien im Hoden unter nahezu keimfreien Bedingungen produziert werden, lassen sich nach der Entnahme in jedem Ejakulat Bakterien nachweisen [72, 74, 111, 335, 347]. Dabei schwanken die Keimzahlen in den Ejakulaten verschiedener Eber und in Ejakulaten des gleichen Ebers stark [6, 24, 347].

Die durchschnittliche Keimbelastung im nativen Ejakulat variiert zwischen 10^4 und 10^5 Kolonie bildenden Einheiten (KbE ml⁻¹) [74]. In verdünnten, mit Antibiotikazusätzen versehenen Spermaportionen werden Werte zwischen 10^0 und 10^6 KbE ml⁻¹ nach einer Lagerung von mindestens 48 Stunden erreicht [55, 74]. Faktoren, die auf die Keimzahl Einfluss nehmen, sind die Methode der Entnahmetechnik, das Volumen der Präputialflüssigkeit, die Absamfrequenz und das Alter des Ebers. Jungeber verfügen über die geringsten Bakteriengehalte im Sperma [93, 97, 193, 210, 371].

Die Mehrheit der bakteriellen Kontaminanten ist gramnegativ und lässt sich der Familie der Enterobacteriaceae zuordnen. Regelmäßig treten auch *Pseudomonas*-Arten auf [7, 55, 191]. Die Keimflora setzt sich aus der Flora des Urogenitaltraktes, aus Schmutz- und Fäkalkontaminanten, aus Besiedlern von Absamungsvorrichtungen und aus Umweltkeimen zusammen [74]. Nach Althouse *et al.* (2000) sind diese Kontaminanten sowohl eberassoziiert (Kot, Präputialsekret, Hautpartikel, Haare und Sekrete des Atmungstraktes) als auch nicht-eberassoziiert (Methode der Spermagewinnung, Leitungswasser, Einstreu, Futter, Lüftungssysteme, Abflüsse und menschlicher Keimeintrag).

Das Präputialsekret des Ebers ist aus Drüsensekreten, abgeschilferten Epithelzellen, Sperma- und Harnresten zusammengesetzt. Es bietet Bakterien günstige Wachstumsbedingungen und entsteht in einer bauchwärts gerichteten Ausbuchtung des Präputialbeutels. Dieses Sekret enthält eine große Anzahl von Keimen und steuert den Hauptteil der im Sperma gefundenen Bakterien bei [1, 73, 198, 269].

Die hygienische Spermaentnahme ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Gewinnung eines keimarmen Ejakulats [7, 377]. Kozumplik *et al.* (1975) zeigten, dass durch eine gute Allgemeinhygiene die Anzahl der eingebrachten Kontaminanten im Durchschnitt von 10^5 auf 10^3 KbE ml⁻¹ Sperma verringert werden kann [201]. Im Vergleich der verschiedenen Techniken der Spermagewinnung (Handmethode, künstliche Vagina und halbautomatisches Absamsystem) bietet die Handmethode den Vorteil, das stark mikrobiell kontaminierte Vorsekret verwerfen zu können [14, 64, 208]. Nachteilig ist, dass die mögliche Sedimentation keimhaltiger Luft zu einem direkten Keimeintrag durch Rekontamination des Spermaauffangbehälters führt [6]. Die künstliche Vagina stellt ein geschlossenes System dar, das den Eintrag nicht-eberassoziiierter Keime erschwert [73, 196]. Lellbach *et al.* (2008) zeigten, dass die Verwendung halbautomatischer Absamsysteme im Vergleich zur Handmethode die Keimbelastung der Ejakulate um 75% reduziert [208].

Der Keimgehalt des verdünnten Spermas verändert sich während der Konservierung durch bestimmte Selektionsmechanismen. Die Keimzahlschwankungen können durch einen Verdünnungseffekt erklärt werden, der für die vorhandenen Keime mit einer Milieuänderung, nachfolgender Adaptationsphase, Konsolidierung und Wachstum verbunden ist. Die Folge ist eine Verschiebung des Keimspektrums im Sinne einer phänotypischen Adaptation [74]. Besonders wichtig ist dafür die Zusammensetzung des Verdünners, die Lagerungsdauer, der Anfangskeimgehalt im nativen Sperma, die Abkühlungsgeschwindigkeit und die Aufbewahrungstemperatur [9, 23, 334, 342, 366, 384]. Steigende Konservierungstemperaturen führen zu einem Anstieg der Keimzahl, da bei höheren Temperaturen das Generationsintervall der

Bakterien abnimmt [16]. Das Keimwachstum wird durch eine thermotemporale Wachstumsdynamik und eine temperaturabhängige Antibiotikaempfindlichkeit beeinflusst [5, 8]. In der Regel wird die Initialkeimvermehrung durch die sofortige Spermaverarbeitung unterbunden, jedoch wirkt die relativ hohe Lagerungstemperatur von 16-18 °C häufig begünstigend auf das Wachstum mesophiler Bakterien [55]. Sone *et al.* (1989) und eigene Untersuchungen belegten, dass in der wärmeren Jahreszeit von Juli bis September die höchsten Bakterienzahlen im Ebersperma zu finden sind [335].

Als kritische Punkte für die Hygiene des Produktionsprozesses im Labor gelten die chemische und mikrobiologische Wasserqualität für die Verdünnerherstellung, der Verdünnerbehälter und die Spermafärbstoffe zur Kennzeichnung der Eberrasse [5, 6, 62, 384]. Wischlappen, Spritzwasser und Rohrpostanlagen sind weitere Schwachstellen im Bereich der Oberflächen- und Lüfthygiene [376, 384]. Da hygienische Maßnahmen allein nicht völlig ausreichend sind, um eine Keimfreiheit zu gewährleisten, wird heute weltweit eine Keimhemmung im konservierten Sperma durch den Zusatz antibiotisch wirksamer Stoffe für notwendig erachtet [49, 172, 222].

2.2 Bedeutung einer bakteriellen Kontamination

Während unter den Bedingungen des Natursprungs Kontaminationen nur geringe Bedeutung für die Befruchtung haben, verursachen unspezifische Keime in den verdünnten Spermaportionen eine Beeinträchtigung der Spermaqualität und Konservierbarkeit [4, 6, 23, 335]. Ein hoher Anfangskeimgehalt ist ein großes Problem für die Konservierung und Fruchtbarkeit. Noch wichtiger ist der spermizide Effekt der bakteriellen Kolonisation bei Verlängerung der Konservierungsdauer. Lebensdauer der Spermien und Keimanzahl verhalten sich gegensätzlich. Dabei stehen Bakterien und Spermien in Nährstoffkonkurrenz zueinander [100, 342].

Eine sprunghafte Keimvermehrung gramnegativer Bakterien im Verdünnermedium, angekündigt durch mikroskopisch sichtbare Agglutinationen und Konglutinationen, bedingt Motilitäts- und Akrosomenintegritätsverluste und führt zur Anhäufung von toxischen Stoffwechselendprodukten, zur Mikromilieuverschiebung, zur Freisetzung von Endotoxinen (Lipopolysaccharid, LPS) und Porinen abgestorbener Bakterien. Symptomatisch sind das massive Auftreten pathologischer Spermienformen und proteolytische Vorgänge [23, 109, 195, 236, 335]. Das Phänomen eines Motilitätsabfalls der Spermien, z.B. hervorgerufen durch *Escherichia coli* (*E. coli*), haben bereits Auroux (1991) und Diemer (1996) *et al.* ausführlich geschildert und auf membranschädigende Einflüsse bakterieller Komponenten zurückgeführt [24, 95]. Nach Wolff *et al.* (1993) wird die Adhäsion von *E. coli* an Spermienkopf und -schwanz durch mannosebindende Strukturen in den Membranen beider Zelltypen ermöglicht [393]. Außerdem weisen Althouse *et al.* (2000) darauf hin, dass Spermienzelltod und Spermienaggregationen verstärkt in einem durch Bakterien hervorgerufenen sauren Medium auftreten.

In der Literatur werden wiederholt Beziehungen zwischen Keimgehalt des Eberspermas und der Fertilität beschrieben [55]. Dafür ist nicht nur der spermizide Effekt relevant, sondern ebenso die Wirkung auf den weiblichen Genitaltrakt. Hochgradige Keimvermehrungen können unter prädisponierenden Bedingungen zu Deckinfektionen beitragen. Die Alteration der Schleimhäute schafft im weiblichen Genitale Angriffsmöglichkeiten für eingeschränkt pathogene Keime [316]. Eine Invasion von Mikroorganismen im weiblichen Genitaltrakt induziert u.a. oxidativen Stress und die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) sowie proinflammatorischen Zytokinen mit pathologischen Konsequenzen. An den Spermien werden apoptoseähnliche Vorgänge ausgelöst [260, 309, 310, 368].

Sone (1990) und De Winter (1994) *et al.* konnten nachweisen, dass nach laparoskopischer Inokulation einer *E. coli*-Suspension in den Uterus einer Gruppe von Sauen während der diöstrischen Phase ein erhöhter Anteil von Sauen mit Endometritiden feststellbar war [88,

333]. Laut Scofield (1974) und Potecea *et al.* (2000) steigert eine durch den Besamungsvorgang verursachte bakterielle Infektion der Gebärmutter bei Sauen die embryonale Mortalität erheblich [286, 318].

2.3 Resistenzsituation

Der Einsatz von Antibiotika kann nicht der Kompensierung mangelhafter Hygienestandards in Besamungseberstationen dienen [161]. Durch fortwährende Anwendung eines Antibiotikums in einem bestimmten Milieu entsteht ein einseitiger Selektionsdruck, der Resistenzen und nosokomiale Infektionen multiresistenter Erreger fördert [58, 83, 178, 200, 249, 365]. Besonders im verdünnten Sperma werden zunehmend antibiotikaresistente Keime festgestellt [7, 8, 222, 300, 347, 384]. Bei allen Wirkstoffklassen lässt sich ein kontinuierlicher Resistenzanstieg beobachten [253]. Die Resistenzentwicklung betrifft aber nicht in gleicher Weise alle Erreger und alle Substanzgruppen. Ebenso wenig sind alle Besamungseberstationen gleichmäßig vom Auftreten resistenter Bakterienstämme betroffen.

Wenn Antibiotika unwirksam für die Bekämpfung der verschiedenen Bakterienspezies werden, entwickelt sich der Verdünner zum Kulturmedium [216, 217]. Durch die Elimination der im Verdünner enthaltenen antibiotikaempfindlichen Keimflora wird eine „Wachstumsnische“ für resistente Keime geschaffen. Zusätzlich im Verdünner enthaltene Stoffe garantieren günstige Wachstumsbedingungen, indem Osmolaritäts- und pH-Schwankungen abgepuffert werden. Wachstumslimitierende toxische Stoffwechselendprodukte der Bakterien und Spermien werden minimiert. Der pH-Wert von 6,8 bis 7,2 im verdünnten Sperma unterstützt ein Wachstum der Bakterien [6]. Letztlich wird einem Absterben der Bakterienpopulation entgegengewirkt [5]. Da an der Regulation der Bakteriendichte bakterielle Quorum-sensing-Komponenten beteiligt sind, die als Signalmoleküle fungieren, können Bakterien durch diese Botenstoffe (z.B. Homoserinlactone) ihre Teilungsrate an ein begrenztes oder verbessertes Nährstoffangebot angleichen [15, 52, 116, 117, 133, 307, 364].

Wenn auch die Menge der zum Verdünner hinzugesetzten Antibiotika in den Besamungseberstationen gleich ist, so bestehen doch große Unterschiede in der tatsächlich wirksamen Konzentration im verdünnten Sperma. Hier gilt, dass bei Zusatz gleicher Antibiotikamengen zum Verdünner bei kleiner werdendem Verdünnungsverhältnis die absolute Menge keimhemmender Substanzen pro Milliliter verdünntes Sperma abnimmt [342]. Problematisch sind ebenfalls Inkompatibilitäten zwischen den Verdünnerbestandteilen. Ein regelmäßiger Fehler ist die Kombination von β -Lactamen und Aminoglykosiden, die unter bestimmten Umständen zur Inaktivierung beider Komponenten führen können [106, 275].

Hohe Zinkkonzentrationen im Seminalplasma des Ebers destabilisieren einige Wirkstoffe, darunter z.B. das Ampicillin. Dafür verantwortlich ist vermutlich eine beschleunigte Spaltung des Antibiotikums durch Metalloproteasen [30, 228]. In bestimmten Medien ist bei 37 °C Gentamicin für etwa fünf Tage stabil. Eine Reduzierung des pH-Wertes unter 6,5 führt zu einer starken Verringerung der Gentamicinaktivität. Ein verstärkter Abbau von Gentamicin findet in Dextroseverdünnern statt [135, 380].

Problematisch ist die übliche Praxis bei der Sperma- und Restverdünnerentsorgung [384]. In den Laborabflüssen der Besamungseberstationen siedelt sich in der Regel eine hochresistente, biofilmbildende Keimflora an, die über Laborutensilien verschleppt wird [34]. Aus der Humanmedizin bekannte Verursacher des Hospitalismus, wie *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens* und *Stenotrophomonas maltophilia*, wurden mehrfach im verdünnten Sperma des Ebers gefunden [5, 8].

Da die Zahl neu zugelassener Antibiotika abnimmt und Resistenzraten ansteigen, sind neue Kandidaten für eine Verdünnersupplementierung nicht in Sicht. Bereits in den 80er Jahren musste die Antibiotikakombination Penicillin-Streptomycin aufgegeben werden. In gleicher Weise werden heute in der Fachliteratur Resistenzen gegen die aktuellen, konventionellen

Aminoglykosidantibiotika beschrieben. Bakterienarten wie *E. coli*, *Pseudomonas* spp., Klebsiellen und *Proteus* spp., *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia* und *Stenotrophomonas maltophilia* sind widerstandsfähig gegen Gentamicin [6, 55, 74, 114, 172, 185, 232, 253, 284, 289, 299, 336, 364, 365, 381].

Im Jahre 2005 wurden in 12% der Spermaportionen aus 17 Besamungseberstationen des Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion gentamicinresistente Keimarten im verdünnten Sperma isoliert [384]. In einer retrospektiven Vielstationenstudie in Nordamerika aus dem Jahre 2008 wurde der Nachweis erbracht, dass in ungefähr einem Drittel der Besamungsportionen eine Bakteriospermie vorhanden war und 86% der Isolate widerstandsfähig gegen die praxisüblichen Antibiotika (Amoxicillin, Gentamicin, Tylosin, Lincomycin, Spectinomycin) waren [8].

2.4 Antimikrobielle Peptide

2.4.1 Klassifikation und Wirkungsmechanismen der antimikrobiellen Peptide

Heute sind mehr als 880 natürliche antimikrobielle Peptide (AMP) bekannt. Unter diesem Begriff werden Polypeptide aus bis zu 100 Aminosäuren zusammengefasst. Eine hohe strukturelle Diversität und die große Anzahl der bisher entdeckten Peptide macht eine Klassifizierung der AMP nach ihrer Primärstruktur äußerst schwierig, so dass für die Einteilung neben der positiven Ladung die Sekundärstruktur zugrunde gelegt wurde [46, 101, 354]. Entsprechend der Sekundärstruktur werden vier Gruppen unterschieden:

- (1) lineare Peptide mit α -helikalen Strukturen [298, 353],
- (2) β -Faltblattstrukturen, die teilweise durch Disulfidbrücken stabilisiert sind [11, 329],
- (3) Peptide mit α -helikalen und β -Faltblattstrukturen [101, 146] und
- (4) lineare, nicht- α -helikale Strukturen, gestreckt oder in Schleifenkonformation auftretende Strukturen, die häufig reich an bestimmten Aminosäuren sind, wie z.B. Prolin, Tryptophan oder Arginin [17, 320].

Gemeinsames Charakteristikum aller Strukturen ist die Amphipathie, die Trennung polarer und hydrophober Reste in separaten Strukturflächen. Die räumliche Trennung des kationischen vom hydrophoben Anteil ist eine der wesentlichen Voraussetzungen für die Wechselwirkung der Peptide mit bakteriellen Membranen [155]. Eine amphipathische Struktur erlaubt es den Peptiden, detergenzähnlich mit den Lipiden der asymmetrischen Bakterienmembran zu interagieren [101]. Coulombsche Wechselwirkungen begünstigen die Bindung der Peptide an die negativ geladenen Kopfgruppen von Lipiden (Phosphatidylglycerol, Cardiolipin). Hydrophobe Wechselwirkungen ermöglichen dann das Eindringen der Peptide in die hydrophobe Region der Lipiddoppelschicht, so dass im Unterschied zu konventionellen Antibiotika Peptide direkt die bakterielle Zellmembran destabilisieren [151, 167, 219, 267].

Im Gegensatz zu prokaryotischen Membranen sind bei eukaryotischen Membranen die negativ geladenen Lipidkopfgruppen größtenteils in der inneren, dem Zytoplasma zugewandten Membran lokalisiert. Eukaryotische Zellmembranen enthalten zwitterionische, gesamtneutrale Phospholipide wie Phosphatidylcholine, Sphingomyeline und Phosphatidylethanolamine. Elektrostatische Interaktionen sind daher gering. Die Anwesenheit von Cholesterol reduziert die Insertion und damit die Aktivität der Peptide gegenüber Eukaryoten [154, 231, 264, 330, 352, 400, 402].

Gramnegative Bakterien verfügen zusätzlich über eine äußere Membran, die reich an stark negativ geladenen Lipopolysacchariden (LPS) ist. LPS bildet den Hauptbestandteil der äußeren Schicht der Membran. Es besteht aus einem lipophilen Anteil, dem Lipid A, und einer hydrophilen Region aus Polysacchariden. AMP können speziell an LPS-Komponenten binden. Sie sind in der Lage, die LPS-Barriere über einen so genannten „self-promoted-

uptake“ zu überwinden und zur Zytoplasmamembran oder in den periplasmatischen Raum der Bakterien vorzudringen. Außerdem wirken die Peptide neutralisierend auf LPS und reduzieren so ihre Endotoxinwirkung [105, 183, 255, 282, 283, 293, 306, 327, 331].

Das Vorkommen anionischer Lipide auf der Oberfläche bakterieller Membranen sowie deren Mangel an Cholesterol werden als wesentliche Faktoren für die Selektivität der AMP gegenüber prokaryotischen Membranen angesehen [32, 356]. Eine Modellvorstellung, die die Membranaktivität der meisten AMP veranschaulicht, ist das „Shai–Matsuzaki–Huang–Modell“ (Abbildung 1).

Voraussetzungen für die peptidinduzierte Membranpermeabilisierung sind [230, 287, 324, 401]: (1) eine positive Peptidladung, die die Akkumulation über elektrostatische Kräfte an der negativ geladenen Zytoplasmamembran der Bakterien begünstigt [174], und (2) eine hydrophobe Peptidomäne, die bei Insertion die dichte Packung der Lipidfettsäureketten stört [224].

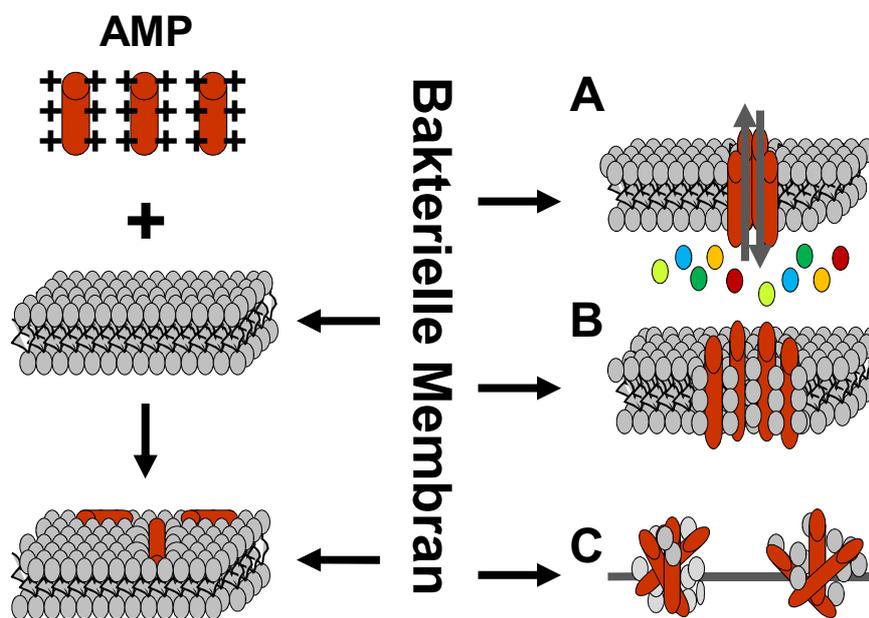


Abbildung 1: Schematisierte Darstellung des „Shai–Matsuzaki–Huang–Modells“, modifiziert nach Brodgen *et al.* (2005).

A: „barrel-stave“-Modell: Mehrere Peptide durchspannen die Membran. Die hydrophile Seite der Peptide formt eine Pore, die durch Wechselwirkung des hydrophoben Peptidbereichs mit dem hydrophoben Bereich der Lipidmatrix der Membran stabilisiert wird. Die transmembrane Porenbildung wird nur durch die Peptide selbst bewerkstelligt.

B: „Toroid“-Modell: An der Porenbildung sind Peptide und Lipide beteiligt. Hydrophile Peptidoberflächen und polare Lipidköpfe kleiden die Pore aus.

C: „carpet“-Modell: Bei Erreichen einer Grenzkonzentration an AMP führt die Destabilisierung der Lipiddoppelschicht durch die Peptide zu einem Kollaps und zur Auflösung der Membran [46].

Durch biophysikalische Untersuchungen wurden drei Modellvorstellungen entwickelt [46]: (1) Nach dem „barrel-stave“-Modell (Abbildung 1A) durchspannen mehrere Peptide die Membran. Die hydrophile Seite der Peptide formt eine Pore, die durch Wechselwirkung des hydrophoben Peptidbereichs mit dem hydrophoben Bereich der Lipidmatrix der Membran stabilisiert wird. Die transmembrane Porenbildung wird nur durch die Peptide selbst bewerkstelligt [263, 267]. (2) An der Porenbildung im „Toroid“-Modell (Abbildung 1B) sind Peptide und Lipide beteiligt. Hydrophile Peptidoberflächen und polare Lipidköpfe kleiden die

Pore aus [221]. (3) Bei Erreichen einer Grenzkonzentration an AMP führt die Destabilisierung der Lipiddoppelschicht durch die Peptide zu einem Kollaps („*carpet*“-Modell, Abbildung 1C) und zur Auflösung der Membran [325, 326].

Bei allen drei genannten Modellen führt die Permeabilisierung der Membran dazu, dass das Membranpotential aufgehoben wird [395]. Für bestimmte Peptide wird auch eine Translokation über die Lipiddoppelschicht ohne Endozytosemechanismen angenommen [261, 346]. Einige Autoren zweifeln an einem bakteriziden Effekt aufgrund von Störungen der Membrintegrität und postulieren alternative Wirkungsweisen [395]. Diskutiert werden die Induktion autolytischer Enzyme, die Hemmung der Protein-, DNA- und Zellwandsynthese, die intrazelluläre Bindung an Rezeptormoleküle und die Reduktion der Membranfluidität [59, 129, 155, 157, 273, 386, 415]. In einem von Derossi *et al.* (1996) veröffentlichten Modell assoziieren die kationischen Restgruppen der Aminosäuren mit den negativ geladenen Phospholipiden und erzeugen so eine Mizelle. Der hydrophile Kern der Mizelle enthält die Peptide, die bei der Fusion mit der Membran ins Zytoplasma freigesetzt werden können [90].

2.4.2 Antimikrobielle Peptide in der Reproduktionsbiologie

2.4.2.1 Spermizid wirkende antimikrobielle Peptide

Eine Reihe von Arbeiten beschreiben spermiostatische und spermizide Wirkungen von AMP auf Säugetierspermien [87, 99, 295, 297]. Derartige exogene AMP, darunter die synthetischen, helikalen Magainine A und G, wurden als Kontrazeptiva geprüft und eine konzentrationsabhängige Verminderung der Spermienmotilität für Hamster, Ratte und Mensch aufgezeigt. Bei Hutaffen (*Macaca radiata*) führte eine intravaginale Applikation von Magainin A erfolgreich zur Kontrazeption [61]. In Konzentrationen oberhalb von 250 µg/ml wirkten Magainine u.a. embryotoxisch [311].

In Experimenten wurde weiterhin festgestellt, dass Seminalplasmakomponenten (z.B. Proteasen) Einfluss auf die spermizide Effektivität der Magainine nehmen und dadurch deren Aktivität verringert wird [99]. Magainine beeinträchtigen die mitochondriale Energiebilanz durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung [392]. Die Entfernung von Cholesterol aus der humanen Spermienmembran mittels Zyklodextrin potenziert den spermiziden Effekt des Magainins [392]. Ähnliche Wirkungen konnten an Embryonen bestätigt werden [250].

Andere spermizid wirkende antimikrobielle Peptide sind das Nisin, das Dermaseptin, das Gramizidin und das Maximin [20, 43, 53, 204, 408]. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) steigert die spermizide Aktivität von Dermaseptin und Gramizidin. Die elektrostatischen Wechselwirkungen vervielfachen sich, da sich die negative Oberflächenladung der Spermien erhöht [43, 408]. Histopathologische Veränderungen im Vaginalepithel oder biochemische Veränderungen im Blutprofil konnten nach örtlicher Applikation verschiedener Peptide bei Probandinnen nicht nachgewiesen werden.

2.4.2.2 Befruchtungsrelevante antimikrobielle Peptide und Proteine

Während exogene AMP eine dosis- und zeitabhängige toxische Wirkung auf Säugetierspermien haben, findet man im männlichen Genitaltrakt eine Reihe von endogenen Substanzen, die neben ihrer antimikrobiellen Aktivität offenbar auch für den Befruchtungsprozess relevante Funktionen besitzen. Diese Peptide werden überwiegend im Nebenhoden während der Spermienreifung synthetisiert, von den Epithelien des Nebenhodenganges ins Lumen sezerniert und dann an die Spermienoberfläche gebunden [50, 112, 113, 197, 303].

β-Defensine sind eine wichtige Gruppe von AMP, die im Nebenhoden von Mensch, Schwein, Affe, Ratte und Maus gebildet werden. Sie sind Teil der angeborenen Immunabwehr, haben eine Barrierefunktion im Genitaltrakt und spielen als Schlüsselmoleküle eine Rolle bei der Spermienreifung, bei der Kapazitation der Spermien und bei der Fertilisation. Defensine

wirken chemotaktisch auf dendritische Zellen und T-Lymphozyten. Die Expression der Defensine wird durch Androgene reguliert und im Bedarfsfall durch Entzündungssignale ausgelöst. Ein wichtiges Strukturmotiv der β -Defensine ist die Disulfidbrücke, die sie sehr stabil gegen eine bakterielle Proteolyse macht [120, 121, 173, 181, 215, 317, 341, 397, 399, 404, 405, 409, 418]. Spezielle Defensine des Nebenhodens von Ratten wirken antimikrobiell gegen *E. coli* und ändern die Aktivität von Calciumionenkanälen, die für die Spermienreifung während der Nebenhodenpassage wichtig sind. Die Calciumakkumulation hatte dabei einen direkten Einfluss auf das Bewegungsmuster der Spermien und den Anteil progressiv motiler Spermien [45, 143, 176, 418]. Nach Jalkanen *et al.* (2005) vermittelt die C-terminale Domäne der Peptide über hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung an die postakrosomale Region und den Halsbereich der Spermien. Die antimikrobielle Funktion wird durch α -helikale Strukturelemente der C-terminalen Domäne gesichert, über die bakterielle Lipopolysaccharide gebunden werden [173].

Über 70% der im bovinen Seminalplasma vorkommenden Peptide sind mit Prostatosomen assoziiert, also Liposomen, die vom Epithel der Prostata gebildet werden. Bei der Fusion mit der Zellmembran der Spermien gelangen so inaktive, endogene, antimikrobielle Peptide an die Oberfläche der Plasmamembran [21, 147, 206, 223]. Dabei wird die Membran zusätzlich mit Cholesterol angereichert. Cholesterol verhindert die spermientoxische Wirkung endogener Peptide. Die Abwesenheit des Cholesterols in der bakteriellen Plasmamembran ist für die Zytotoxizität gegenüber Prokaryoten verantwortlich [10].

Kationische antimikrobielle Proteine (CAP) wurden auch aus azidophilen Granula neutrophiler Granulozyten isoliert. Sie werden bei der Phagozytose von Spermien im Genitaltrakt der Frau abgegeben und verfügen über antibiotische, chemotaktische und Endotoxin-neutralisierende Eigenschaften [71, 274]. Ein bioaktives synthetisches Fragment der CAP ist das synthetische Peptid P20-44, das zu einer reversiblen Hemmung der Spermienmotilität führt, ohne eine Beeinflussung der akrosomalen und mitochondrialen Membranen hervorzurufen. Auch hier ist die α -helikale, amphipathische Struktur der Aminosäuresequenz für die Wechselwirkungen mit der bakteriellen Membran ausschlaggebend. Fünf weitere kationische AMP mit identischer Nettoladung hatten keinen Einfluss auf die Spermienmotilität, aber eine breite antimikrobielle Aktivität [71]. D'Cruz *et al.* (1995) gehen davon aus, dass für die Regulation der Spermienmotilität rezeptorvermittelte Interaktionen zwischen dem synthetischen Peptid und der negativ geladenen Spermienoberfläche von Bedeutung sind, die eine membrangekoppelte Signaltransduktionskaskade kanalisieren.

Die im männlichen Genitaltrakt von Mensch, Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) und Maus typisierten Zystatine weichen von den bisher beschriebenen Wirkmechanismen ab [146]. Zystatine werden im Hoden, Nebenhoden, in der Prostata, der Samenblasendrüse und anderen Geweben synthetisiert. Sie fungieren als Zystein-Protease-Inhibitoren und verändern über unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen Kathepsin- und andere Enzymaktivitäten, die für Reifungsprozesse der Spermien erforderlich sind. Zystatin verringerte auch das Wachstum von Streptokokken und anderer Bakterien im Reproduktionstrakt von Rhesusaffen. Das Koloniewachstum von *E. coli* wurde durch Koinkubation mit Zystatin um 70% reduziert. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass:

- (1) einige exogene AMP eine spermientoxische Wirkung zeigen und als Kontrazeptiva nutzbar sind,
- (2) endogene AMP an die Oberfläche der Spermien binden, antimikrobiell sowohl im männlichen als auch im weiblichen Genitale wirken und dort zur Modulation der Immunantwort und Elimination von Pathogenen beitragen,
- (3) endogene AMP Einfluss auf die Maturation und das Motilitätsverhalten der Spermien nehmen und anderweitige Funktionen im Rahmen der Befruchtungskaskade besitzen,
- (4) infolge eines Überhangs basischer Aminosäuren und sich daraus ergebenden kationischen Eigenschaften AMP bevorzugt mit negativ geladenen Oberflächen von

Mikroorganismen interagieren und dabei amphipathische Sekundärstrukturelemente Wechselwirkungen mit Membrandomänen der Mikroben ermöglichen und

(5) der Einsatz von AMP konzentrations- und zeitabhängig zur Depolarisierung, Permeabilisierung und schließlich zur Lyse der Zielzellen führen kann.

2.4.3 Die zyklischen Hexapeptide c-RRWWWR und c-RRWFWR

Bisherige Versuche zur Steigerung antimikrobieller Wirksamkeit von Peptiden waren im Wesentlichen auf lineare, potentiell helixbildende Peptide beschränkt [77, 353]. Einige Peptide, die reich an bestimmten Aminosäuren, wie Prolin (P), Phenylalanin (F), Arginin (R) oder Tryptophan (W), sind, kommen als antimikrobielle Motive natürlicher Proteine vor [101, 312]. Zur Gruppe dieser R- und W-reichen antimikrobiellen Sequenzen zählen Hexapeptide, die vor einigen Jahren aus einer kombinatorischen Peptidbibliothek abgeleitet wurden [36, 165]. Die Zyklisierung der aus sechs L-Aminosäuren bestehenden Sequenzen führte zu hochaktiven Analoga (Abbildung 2). Dazu tragen die geringe Anfälligkeit gegenüber enzymatischem Abbau und die geringe Größe bei, die die Synthesekosten und das Risiko einer immunogenen Antwort begrenzen [19, 78, 343, 344, 382].

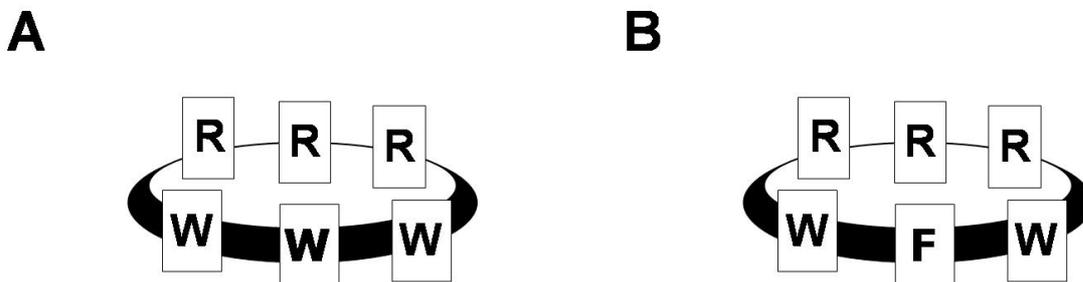


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der zyklischen Hexapeptide (A) c-RRWWWR und (B) c-WRRRWF [183]. Die Zyklisierung aus sechs L-Aminosäuren (R=Arginin, W=Tryptophan, F=Phenylalanin) führt zu antimikrobiell hochaktiven Peptiden, modifiziert nach Junkes *et al.* (2008).

Mit standardisierten Verfahren, wie der Festphasensynthese, konnten solch einfach strukturierte Peptide schnell und in größeren Mengen produziert werden. Die Sequenz synthetischer Peptide ist im Vergleich zu rekombinant hergestellten Peptiden oder Proteinen einfach zu modifizieren, so dass sich die biologische Aktivität leichter optimieren lässt [54]. Allgemein geht mit einer Sequenzreduktion unter zehn Aminosäurereste die Fähigkeit zur Bildung einer amphipathischen Helix als Voraussetzung für die Membranaktivität verloren [77]. Peptide, die aus zwei bis vier Aminosäuren aufgebaut sind und aufgrund dominierender, aromatischer Reste eine hohe Hydrophobizität besitzen, sind zwar antibakteriell aktiv, weisen gleichzeitig aber auch eine hohe, nicht erwünschte Zytotoxizität auf [343, 370].

In Arbeiten am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) wurde festgestellt, dass durch Optimierung der Sequenzabfolge und erhöhte Clusterung aromatischer Aminosäurereste (v.a. Tryptophan) in „*head-to-tail*“ zyklisierten Peptiden die antimikrobielle Aktivität gesteigert werden kann. Eine Zyklisierung des Rückgrats zieht zugleich eine Erhöhung der Zytotoxizität gegenüber Eukaryoten nach sich [78, 91, 159, 359, 382, 394].

Der antimikrobielle Effekt der Hexapeptide wird in erster Linie durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Lipidmatrix der Bakterienzelle und den

drei positiv geladenen Arginin-(R)-Resten (Abbildung 2) bestimmt [54]. Als Folge dessen setzen sich die Peptide an der Membranoberfläche fest und bilden Peptid-Lipid-Komplexe aus, die zu einer Störung der gesamten Phospholipidorganisation führen können [80]. Nach initialer Bindung an die Phospholipidkopfgruppen können sich die Peptide über hydrophobe Wechselwirkungen in den apolaren Bereich der Membran setzen und die Membran lokal destabilisieren.

Hexapeptide zeichnen sich durch eine hohe Selektivität für gramnegative Bakterien aus, die bei Substitution des Tryptophans oder Arginins abnimmt [183]. Die Bildung transmembranaler Poren ist aufgrund der geringen Größe der Hexapeptide unwahrscheinlich [177]. Aus dem Leitmotiv c-RRWWRF wurden durch Junkes *et al.* (2008) die optimierten Hexapeptidsequenzen c-RRWFWR und c-RRWWWR (Abbildung 2) abgeleitet [183]. Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) wurden zwei Laborstämme ausgewählt (grampositiv: *B. subtilis* DSM 347; gramnegativ: *E. coli* DH-5 α ; Kap. 3.1, Tabelle 1).

Hexapeptide mit hoher antimikrobieller Aktivität sind gewöhnlich durch MIC-Werte im mikromolaren Konzentrationsbereich (MIC < 5 μ M) charakterisiert [19]. Zytotoxizitätsstudien an eukaryotischen Zellen wurden an humanen Erythrozyten durchgeführt [183]. Generell ist die hämolytische Aktivität der Hexapeptide moderat. Je hydrophober und amphipathischer das Peptid ist, desto größer ist der unerwünschte lytische Effekt auf Säugerzellen [18]. Bakterielle Selektivität, Proteolysestabilität und thermodynamische Widerstandsfähigkeit machen Zyklopeptide zu vielversprechenden Leitstrukturen für eine anwendungsorientierte Weiterentwicklung als peptidische Antibiotika [354].

2.4.4 Die helikalen Magainin-Derivate MK5E und IVWTI-M2a

Im Jahre 1987 isolierten Zasloff *et al.* eine Gruppe von AMP aus den Schleimdrüsen der Haut des Afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*). Diese antimikrobiellen Wirkstoffe wurden als Magainine bezeichnet. Magainine sind lineare, α -helikale Peptide mit einer Länge von 23 bis 27 Aminosäuren (Abbildung 3). Sie besitzen schon in sehr geringen Konzentrationen ein sehr breites Wirkungsspektrum gegen eine Vielzahl von Bakterien, Pilzen und Einzellern. Einer Reihe von Magaininabkömmlingen wurde eine antitumorale Wirkung zugeschrieben [25, 69, 229, 262, 337, 353, 411, 413]. Gut untersucht ist die direkte Wechselwirkung der Magainine mit der gramnegativen bakteriellen Membran. Mit hoher Affinität bindet die amphipathische Helix des Magainins an Lipopolysaccharide (LPS). Hydrophobe Wechselwirkungen resultieren in einer Depolarisation und Destabilisierung der prokaryotischen Membran. Es kommt zur Bildung von Ionenkanälen, zum Verlust des transmembranen Potentials und Ionengradienten und damit schließlich zur Lyse der Zielzellen [81, 98, 184, 226, 294, 359, 413].

Einige Magainin-Derivate induzieren an eukaryotischen Membranen einen Lipid-Flip-Flop und akkumulieren anschließend in den Mitochondrien und Zellkernen [169]. Modifizierte Magainin-2-amide (M-2a) hemmen die Spermienmotilität, wirken spermizid und können Akrosomendefekte auslösen [71]. L- und D-Aminosäureenantiomere besitzen das gleiche antimikrobielle Wirkungsspektrum. Yang *et al.* (2000) folgern daraus, dass an der antimikrobiellen Aktivität keine stereospezifischen Rezeptorproteine beteiligt sind und für die Selektivität die Komposition der Lipidmatrix verantwortlich sei [401]. In Arbeiten von Dathe *et al.* (1996 bis 2002) wurden strukturelle Parameter des Magainins überprüft, die die Aktivität und Selektivität der Peptide beeinflussen. Beschrieben wurden Struktur-Funktions-Analysen von „Hybridpeptiden“, der Einfluss der Peptidhelizität, der Aminosäuresequenz, des hydrophoben Momentes, der Größe der polaren und apolaren Domänen, der Nettoladung und Konformation [77, 79-82, 352, 388, 403]. Die Konformation des Magaininmoleküls in Lösung wird hauptsächlich vom Lösungsmittel, vom pH-Wert und von der Temperatur des Milieus festgelegt. Ladungs- und hydrophobe Wechselwirkungen bestimmen die Struktur an Grenzflächen, wie der Lipidmatrix der Zellmembran [12, 13, 226, 313]. Die Aktivität

gegenüber gramnegativen Bakterien ist im Allgemeinen größer als gegenüber grampositiven, da sich die Peptide an der äußeren Zellwand gramnegativer Erreger anreichern. Die hydrophobe Domäne gestattet eine parallele Ausrichtung an der Membranoberfläche, mit anschließender Umorientierung und transmembraner Porenbildung [209].

Ziel war es, strukturelle Motive so anzupassen, dass ein Gleichgewicht zwischen den hydrophoben und elektrostatischen Kräften erreicht werden kann, das zu einer Optimierung der Wechselwirkung mit der Bakterienmembran führen soll. In Abbildung 3B ist das modifizierte Magainin-Derivat MK5E dargestellt, das im Vergleich zum unveränderten M-2a (Abbildung 3A) eine 50-fach höhere antimikrobielle Aktivität und eine 20-fach stärkere bakterielle Selektivität aufweist. Die positive Nettoladung ist für die Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phospholipidkopfgruppen notwendig [229, 390]. Die Amphipathie lässt sich über den hydrophoben Moment quantifizieren [389]. Eine erhöhte Hydrophobizität des Peptids unterstützt nachweislich eine stärkere antibakterielle, aber auch hämolytische Aktivität [387]. Wie aus der Abbildung 3C zu entnehmen ist, führt eine geringfügige Sequenzmodifikation der Aminosäuren bei dem Peptidabkömmling IVWTI-M2a im Vergleich zum Ausgangspeptid (Abbildung 3A) zu einer Erhöhung des hydrophoben Moments.

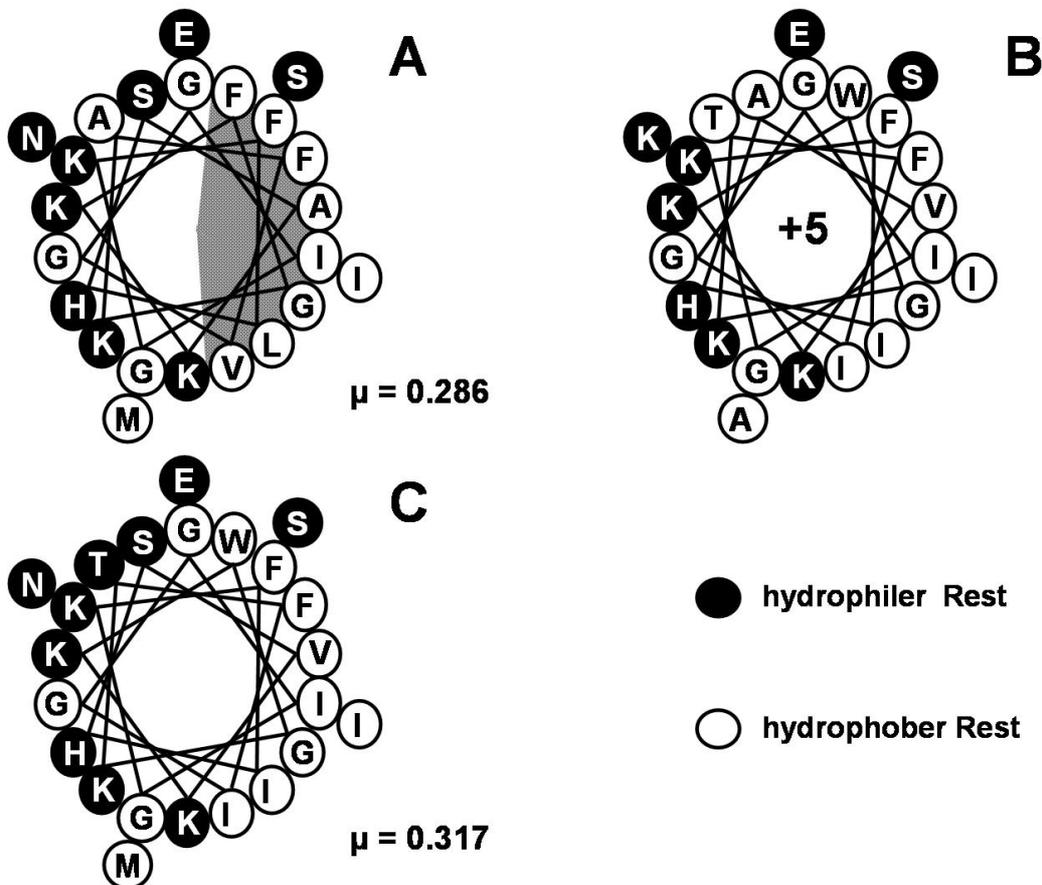


Abbildung 3: A: Schematisierte Darstellung der helikalen Projektion des M-2a (Leitmotiv). Die Zeichnung verdeutlicht die Verteilung der hydrophoben und hydrophilen (kationischen) Reste der amphipathischen Helix [230]. B: Darstellung des optimierten Magainin-Derivats MK5E [79]. C: Veranschaulichung des Magainin-Derivats IVWTI-M2a [389] mit einem erhöhten hydrophoben Moment (μ) im Vergleich zum Ausgangspeptid (A).

2.4.5 Resistenzen gegen antimikrobielle Peptide

Um der Zunahme an Resistenzen zu begegnen, müssen Antibiotika mit neuen Angriffsziele entwickelt werden [288, 379]. Antibiotika sind mit Ausnahme einiger synthetischer Strukturen

aus Bakterien und Pilzen abgeleitet. Ihre Wirkung richtet sich vor allem gegen die Biosynthese von Proteinen, Nukleinsäuren und Zellwandbestandteilen [253]. Analog zu den Abwehrmechanismen niederer Lebewesen verfügen höhere Organismen über ein angeborenes Immunsystem. Ein wichtiger Bestandteil sind antimikrobielle Peptide, die eine sehr heterogene Gruppe darstellen und damit Pathogenen kein einheitliches Strukturmotiv bieten [212, 233, 348].

Bakterien verfügen über die Fähigkeit, die Initialbindung, die Peptidinsertion und die Membranpermeabilität zu modifizieren [46, 276]. Zu diesem Zweck werden beispielsweise äußere Membranbestandteile verändert, insbesondere Anteile des Lipopolysaccharids oder der Phospholipide, indem positive Ladungen eingefügt werden. Dadurch schränken die Bakterien den „self-promoted-uptake“ ein und sind weniger empfänglich für AMP [92, 139, 141, 142, 277, 322].

Die antimikrobielle Aktivität der AMP hängt sehr stark vom Mikromilieu ab. Als kritischer Ionenfaktor gilt u.a. Carbonat. Je nach Exposition kann es anscheinend die Zellwandsynthese oder Genexpression der Bakterien beeinflussen und damit unter zellphysiologischen Bedingungen den Angriff der AMP erleichtern oder erschweren [96, 280].

Bereits in den 80er Jahren konnten durch Zasloff, Viljanen und Manniello Primärresistenzen gegen AMP nachgewiesen werden. Sie zeigten, dass polykationische AMP unwirksam gegen mehrere Isolate waren, zu denen *Proteus*, *Serratia*, *Providencia*, *Burkholderia* und *Streptococcus* zählten [225, 327, 367, 411]. *Staphylococcus (St.) aureus* ist anscheinend ebenfalls in der Lage, Resistenzen gegenüber Defensin, Magainin, Nisin und Protegrin zu entwickeln. Der grampositive, biofilmbildende Keim verändert die Oberflächenladung durch den Einbau positiv geladener Aminogruppen. Dies führt zu einer partiellen Neutralisierung der Membran mit Reduktion der elektrostatischen Wechselwirkungen [29, 202, 278, 279].

Salmonella (S.) enterica und *Pseudomonas (P.) aeruginosa* verändern enzymatisch das anionische Lipid A des LPS der äußeren Membran. Die Folge ist eine geringere Peptidinitialbindung. Dieser Abwehrmechanismus erklärt auch die natürlichen Resistenzen von *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri* und *Serratia marcescens* gegen AMP [28, 38, 102, 140, 142, 308]. *Klebsiella (K.) pneumoniae* und *P. aeruginosa* bilden spezielle Kapselpolysaccharide aus, *Yersinia enterocolitica* äußere Membranproteine, die den Angriff der AMP stark einschränken [51, 115, 369].

Ein weiterer Resistenzmechanismus besteht in der gezielten Produktion von bakteriellen Proteasen. Proteasen inaktivieren enzymatisch AMP [138, 140, 314, 345, 358]. Für das Kathelizidin LL-37 wurde gezeigt, dass es durch die Metalloproteinase Aurelysin von *St. aureus* inaktiviert wird [266, 328]. Magainine werden u.a. durch die Aktivität der Magaininasen von *Proteus* inhibiert [31]. Eingedrungene Peptide können auch energieabhängig über Effluxpumpen, die in der Zytoplasmamembran der Bakterien lokalisiert sind, aus der Zelle transportiert werden [29, 213, 254, 323, 357]. Die Bildung extrazellulärer Polymere (Biofilm) macht Bakterien zusätzlich unempfindlich [268].

Die Zytoplasmamembran als Hauptangriffsort der AMP wird ansonsten bei Resistenzbildungen nicht verändert, da die Membran ursächlich an der Erzeugung eines Ionengradienten beteiligt ist. Eine Veränderung der Lipidzusammensetzung würde auch eine Veränderung der Energieerzeugung zur Folge haben. Eine Resistenzentwicklung ist erschwert und begünstigt damit den Einsatz antimikrobieller Peptide [145].

2.4.6 Synergiemechanismen

Bekannt ist der Synergismus zwischen einzelnen Peptiden [26, 192, 207, 349, 383, 410], zwischen Peptiden und Chelatbildnern [44, 220, 340] und zwischen Peptiden und konventionellen Antibiotika [75, 152, 265, 416]. Synergistische Wechselwirkungen machen einen Peptideinsatz effektiver [396]. Eine Anzahl von Peptiden, darunter Laktoferrin,

Lysozym und Polymyxin B, permeabilisieren die äußere Membran gramnegativer Bakterien derart, dass die MIC für antibiotische Zusätze um das 300-fache reduziert werden konnte [361]. Darüber hinaus zeigten Kombinationen aus Nisin und praxisüblichen Antibiotika gute Wirkung gegen Methicillin-resistente *St. aureus* (MRSA)-Stämme [296].

Polykationische Peptide zeichnen sich dadurch aus, dass sie über entsprechende elektrostatische Wechselwirkungen die anionische Komponente des LPS binden und synergistisch den Angriff und die Translokation von lipophilen oder amphiphilen Wirkstoffen vorbereiten und beschleunigen [151]. Viele der permeabilisierenden Peptide sind vom Polymyxin B abgeleitet. Sie enthalten als Strukturmotiv eine Disulfidbrücke oder sind durch alternierende hydrophile und hydrophobe Aminosäurereste gekennzeichnet. Experimente von Vaara und Porro zeigten, dass Keime, wie *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae* und *S. typhimurium*, sehr gut für einen „postantibiotischen“ Effekt sensibilisiert werden [360-363]. Giacometti *et al.* (2000) führten den Synergismus auf eine Aktivitätssteigerung der bakteriellen Mureinhydrolase zurück, die das Peptidoglykangerüst direkt schädigt und den Antibiotikainflux erhöht [127].

3 Material und Methoden

3.1 Peptidmaterial

Die Peptide (Tabelle 1) wurden mittels automatischer Festphasen-Synthese (Syntheseautomat ABI 433A) unter Nutzung eines Standardprotokolls durch die Firma Biosyntan hergestellt. Die synthetischen Peptide wurden mittels analytischer RP-HPLC (reverse-phase high performance liquid chromatography) auf ihre Reinheit überprüft.

Für die Lagerung und den Transport wurden die Peptide lyophilisiert, im Labor des Instituts für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönnow e.V. (IFN) in Aqua bidest. gelöst und je nach Bedarf bei 4 °C bzw. bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Peptidmaterial, Bestimmung der MIC [µM] unter Verwendung von Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Nomenklatur	Aminosäuresequenz	MW [g/mol]	MIC [µM] <i>E. coli</i> DH5α	MIC [µM] <i>B. subtilis</i> DSM 347	Hämolyse [%] bei 100 µM Peptidzusatz
WFW	c(RRWFWR)	989,5	3,1	3,1	6,1
WWW	c(RRWWWR)	1027,2	1,6	0,8	6,6
IWWTI-M2a	GIGKF IHSVK KWGKT FIGEI MNS-NH ₂	2577,1	2,3	12,5	<1
MK5E	GIGKF IHAVK KWGKT FIGEI AKS-NH ₂	2515,1	0,8	1,6	<1

MW = Molekulargewicht, MIC = minimale inhibitorische Konzentration

3.2 Versuchsaufbau

Für die Versuche standen flüssigkonservierte Spermien von Ebern der Rasse Deutsches Edelschwein, Deutsche Landrasse, Piétrain und Duroc zur Verfügung. Alle Ejakulate wurden mit der „Handmethode“ in zwei Besamungseberstationen gewonnen, nach der Gewinnung mit BTS-Verdünner (Tabelle 2, Fa. Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) versetzt, auf 2×10^9 Spermien pro Besamungstube (90 ml) eingestellt und entsprechend Abbildung 4 abschnittsweise in einem „split-sample“-Verfahren aufbereitet [35]. Die Proben wurden anschließend eine Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 16 °C bis zur Verwendung in einem Klimaschrank (Fa. Minitüb) gelagert.

Im Versuch A (Kap. 4.1) wurden zur Charakterisierung von Lagerungs- und Konzentrations-effekten jeweils neun Ejakulate in einem „split-sample“-Verfahren mit den Hexapeptiden (Kap. 2.4.3) WWW (V₁₋₂) und WFW (V₃₋₄) und den Magainin-Derivaten (Kap. 2.4.4) IWWTI-M2a (V₁₋₂) und MK5E (V₃₋₄) aufbereitet. Die Variante V₅ enthielt in beiden Peptidgruppen zusätzlich 0,5 µM Gentamicin.

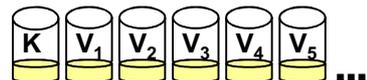
Tabelle 2: Zusammensetzung des BTS-Verdünners (Fa. Minitüb), nach Johnson [179]

Beltsville-Thawing-Lösung (BTS)	[mM]
NaHCO ₂	15
Na-Zitrat	23
KCl	10
Glukose	205
EDTA	3,7
pH-Wert	≈ 7,4
Osmolarität	300mOsmol

Nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung wurde der Einfluss der AMP-Supplementierung im Vergleich zum Standardverdünner (K: BTS + 544 µM Gentamicin) analysiert. Die Peptidkonzentrationen bewegten sich im Bereich der einfachen und doppelten MIC (Tabelle 1). Diese wurden am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) an zwei Laborstämmen (*E. coli* DH-5α, *B. subtilis* DSM 347) bestimmt [79, 183].

Im Versuch B (Kap. 4.2) wurden mittels computerassistierter Spermienmotilitätsanalyse die Effekte einer AMP-Supplementierung auf die Spermienmotilität in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration analysiert. Nach 24 Stunden Lagerung wurden dafür konservierte Ejakulate (n = 12) in einem „split-sample“-Verfahren bei 38 °C für fünf Minuten mit steigenden Konzentrationen (5 - 40 µM) der Peptide WFW, WWW, MK5E (Tabelle 1) und der fluoreszenzmarkierten Peptide WWW[F] und [F]-M2a (Kap. 3.8, Tabelle 11) inkubiert.

„Split-sample“-Verfahren



Versuch A - Kap. 4.1 (n = 9)

K: BTS + 544 µM Gentamicin

V ₁ : BTS + 2 µM [WWW]	bzw. 2,5 µM [IVWTI-M2a]
V ₂ : BTS + 4 µM [WWW]	bzw. 5 µM [IVWTI-M2a]
V ₃ : BTS + 4 µM [WFW]	bzw. 1 µM [MK5E]
V ₄ : BTS + 8 µM [WFW]	bzw. 2 µM [MK5E]
V ₅ : BTS + 2 µM [WWW] + 0,5 µM Gentamicin	bzw. 1 µM [MK5E] + 0,5 µM Gentamicin

Versuch B - Kap. 4.2 (n = 12)

K: BTS + 544 µM Gentamicin

5 µM:	WFW; WWW; WWW[F]; MK5E; [F]-M2a
10 µM:	WFW; WWW; WWW[F]; MK5E; [F]-M2a
20 µM:	WFW; WWW; WWW[F]; MK5E; [F]-M2a
40 µM:	WFW; WWW; WWW[F]; MK5E; [F]-M2a

Versuch C - Kap. 4.3 (n = 20)

K: BTS + 544 µM Gentamicin

V ₁ :	BTS + 34 µM Gentamicin
V ₂ :	V ₁ + 4 µM [WFW]
V ₃ :	V ₁ + 2 µM [WWW]
V ₄ :	V ₁ + 1 µM [MK5E]

Abbildung 4: Versuchsaufbau (K: Kontrollprobe, V₁-V₅: Versuchsvarianten)

Ziel des Versuchs C (Kap. 4.3) war die Prüfung synergistischer Effekte zwischen dem Antibiotikum Gentamicin und den synthetisch hergestellten Peptiden WFW (V₂), WWW (V₃) und MK5E (V₄). Die Peptide und deren Konzentrationen (4 µM WFW, 2 µM WWW und 1 µM MK5E) wurden durch die Versuche A und B festgelegt. Unabhängig von den Ergebnissen

der MIC-Bestimmung des Gentamicins (Kap. 4.1.6) wurde die Dosis in den Varianten V_{1-4} auf $34 \mu\text{M}$ reduziert. Die Variante V_1 enthielt kein Peptid. Als Kontrollverdünner diente BTS + $544 \mu\text{M}$ Gentamicin. Es wurde an 20 Ejakulaten in einem „split-sample“-Verfahren untersucht, ob sich die einzelnen Varianten V_{1-4} spermatologisch nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung vom Kontrollverdünner unterschieden.

Parallel zu den *In-vitro*-Untersuchungen (Tabelle 3) wurden alle Proben im Versuch A und C nach Glycerin-Supplementierung (1:3) in flüssigem Stickstoff kryokonserviert [122] und mikrobiologisch am Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW, Abteilung Bakteriologie) untersucht.

Weiterführende Untersuchungen dienen der Analyse der Peptid-Spermien-Wechselwirkung. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM, Kap. 3.8 und 4.4) und die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR, Kap. 3.9 und 4.5) wurden am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie bzw. am Institut für Biologie und Molekulare Biophysik der Humboldt Universität Berlin durchgeführt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Methodenspektrum

Methoden	Versuch A	Versuch B	Versuch C
Spermienmorphologie (u.a. NAR)	X		X
pH-Wert	X		X
Spermienmotilität (CASA)	X	X	X
Membran- und Akrosomstatus	X		X
Mitochondrienaktivität			X
Mikrobiologische Untersuchung	X		X
Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	separate Analyse (Kap. 4.4)		
Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR)	separate Analyse (Kap. 4.5)		

3.3 Akrosomenmorphologie

Die morphologische Beurteilung der Spermien im Feuchtpräparat erfolgte nach dem Standardprotokoll des IFN. Dafür wurden Veränderungen an Kopf, Kopfkappe, Mittel-, Haupt- und Endstück erfasst. Spermien mit „Normalem Apikalen Rand“ (NAR) wurden gesondert ermittelt. Der Anteil der NAR Spermien wurde in Prozent angegeben [68, 150, 180, 290, 338, 414].

Native und konservierte Spermaproben wurden mit phosphatgepufferter Formol-NaCl-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) auf eine Konzentration von 50×10^6 bis 100×10^6 Spermien pro Milliliter verdünnt. Das Verdünnungsverhältnis betrug für natives Ebersperma 1:6 und für konserviertes Sperma 1:2 (Tabelle 4).

Fixierlösung (1%ige Formol-pNaCl-Lösung, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

- Phosphatgepufferte NaCl-Lösung pH 7.0 (pNaCl)
 - 16,1 ml Pufferstammlösung A: $0,5 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$
 - 8,9 ml Pufferstammlösung B: $0,5 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ mit H_2O auf 100 ml auffüllen
 - Zusatz von 200 ml 0,9%iger NaCl-Lösung
- 1 ml 37%ige Formaldehydlösung zu 100 ml pNaCl

Tabelle 4: Verdünnungsverhältnis zur Herstellung der Feuchtpräparate

Probe	Verdünnung	Sperma [μ l]	Fixierlösung [μ l]
nativ	1:6	100	500
konserviert	1:2	200	200

Nach Vorlage der entsprechenden Menge 1%iger Formol-pNaCl-Lösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße erfolgte die Zugabe der nativen oder konservierten Spermaprobe in aliquoter Menge. Aus der fixierten Probe wurden 4 μ l auf einen Objektträger (ISO 8073, 76 x 26 mm) gegeben und mit einem Deckglas (DIN 58884, 18 x 18 mm) abgedeckt. Anschließend wurde bei 800-facher Vergrößerung die mikroskopische Beurteilung von 200 Spermien je Präparat im positiven Phasenkontrast durchgeführt (Jenaval, Fa. Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland).

3.4 pH-Wert-Messung

Die pH-Wert-Messung [372, 373] wurde elektrometrisch mittels einer Glaselektrode (WTW-Standardpuffer) unter Beachtung der Temperaturkorrektur durchgeführt (pH 537, WTW, Weilheim, Deutschland).

3.5 Computerassistierte Spermienmotilitätsanalyse (CASA)

Zur objektiven Beurteilung der Spermienbewegung kam das CASA-System SpermVision (Fa. Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) zum Einsatz. Das SpermVision-System besteht aus einem Mikroskop (Olympus CX31) mit integrierter Digitalkamera (60 Frames/s, Verschlusszeit 1/120.000 s) sowie angeschlossenem PC. Das Mikroskop verfügt über ein 20 x 0,5 Objektiv mit negativem Phasenkontrast. Zusätzlich ist das Mikroskop mit einem temperierbaren Kreuztisch und einer Rastermechanik ausgerüstet.

Während einer Messung wurde innerhalb von 0,5 Sekunden pro Gesichtsfeld eine Serie von 30 Bildern aufgenommen und durch das Auswerteprogramm SpermVision beurteilt. Durch Vergleich von 30 Bildern einer Serie wurden die von den Spermien zurückgelegten Wegstrecken erkannt und hieraus die Motilitätsparameter errechnet. Abbildung 5 zeigt eine schematisierte Darstellung der Bewegungsparameter. Im Ganzen wurden je Spermaportion 1000 Spermien bzw. 15 Messfelder ausgewertet. Der Mittelwert aller Motilitätsdaten der einzelnen Gesichtsfelder stellte das Ergebnis einer Messung dar.

Weiterhin wurden durch das System Parameter erfasst, die die Geschwindigkeit der Fortbewegung und die Bewegungsbahn der Spermien wiedergaben. Insgesamt resultiert die Vorwärtsbewegung der Spermien aus der Funktion des Flagellarapparates mit dem Ergebnis einer Sinus-Kurvenform als Spermienbahn [27, 47, 84, 85, 94, 131, 163, 164, 350, 374, 375].

Als Maß für die Intensität der Kopfauslenkung wurden die durchschnittliche Kopfamplitude (ALH) um die geglättete Bahn (DAP) der Spermienbewegung, der durchschnittliche Auslenkungswinkel (AOC) und die Auslenkungsfrequenz (BCF) gemessen. Insgesamt wurden durch die CASA 11 Messparameter erfasst, die in Tabelle 5 dargestellt sind [2, 241, 305]. Zur Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit wurde die real zurückgelegte Strecke (DCL) vermessen und dann die geglättete Bahn (DAP) unter dieser berechnet. Die direkte Entfernung zwischen Startpunkt und Endpunkt (DSL) im Messzeitraum wurde ebenfalls erfasst [238, 239, 302].

Tabelle 5: Definitionen der gemessenen Parameter und ihre Bedeutung

Abkürzung	Beschreibung	Maßeinheit
ALH	amplitude of lateral head displacement (Amplitude der Kopfauslenkung)	μm
AOC	average orientation change of the head (Auslenkungswinkel)	$^{\circ}$ (Grad)
BCF	beat cross frequency (Kopfauslenkungen s^{-1})	Hz
DAP	distance average path (Gemittelte Bahn)	μm
DCL	distance curved line (tatsächlich zurückgelegte Strecke)	μm
DSL	distance straight line (linearisierte Strecke)	μm
LIN	linearity (Linearität) - Quotient aus VSL/VCL	
Radius	Bahnradius	μm
VAP	velocity average path (Geschwindigkeit der geglätteten Bahn)	$\mu\text{m s}^{-1}$
VCL	velocity curved line (Spurgeschwindigkeit)	$\mu\text{m s}^{-1}$
VSL	velocity straight line (Geschwindigkeit der linearen Strecke)	$\mu\text{m s}^{-1}$

Aus den zurückgelegten Distanzen und dem Messzeitraum ergaben sich die korrespondierenden Geschwindigkeiten VCL, VAP und VSL. Als Maß für die Geradlinigkeit der Bewegung wurde der Parameter LIN berechnet, der sich aus dem Quotienten VSL/VCL ermitteln ließ. Tabelle 6 gibt die für die Charakterisierung der Spermienmotilität erforderlichen Klassifizierungen wieder.

Tabelle 6: Klassifizierung der Spermien

Klasse	Bedingung
Lokal Motile	$\text{DSL} \leq 4,5 \mu\text{m}$
Progressiv Motile (PROG)	$\text{DSL} > 4,5 \mu\text{m}$
Linear Motile (LIN)	$\text{STR} > 0,9$; $\text{LIN} > 0,5$
Nichtlinear Motile	$\text{STR} < 0,9$; $\text{LIN} < 0,5$
Hyperaktive (HYPER)	$\text{VCL} > 80 \mu\text{m s}^{-1}$; $\text{LIN} < 0,65$; $\text{ALH} > 6,5 \mu\text{m}$
Kreisläufer (KREIS)	$\text{DAP} / \text{Radius} \geq 3$; $\text{LIN} < 0,5$
Immotile (IMMOT)	$\text{AOC} < 2,2 \mu\text{m}$

Für die Vermessung am SpermVision wurden die Spermaportionen dem Klimaschrank entnommen, gemischt und Messproben von 1,5 bzw. 10 ml in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Messproben wurden vor der Untersuchung je nach Aufgabenstellung 10 Minuten oder 30 und 300 Minuten lang (Thermoresistenztest-TRT) in einem Wärmeblock mit Heitzisch (Labnet AccuBlock HT200, Fa. Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) bzw. in einem Wasserbad (GFL 1002, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) bei 38°C unter Luftzutritt inkubiert.

Für die Messungen wurde eine Probenmenge von $2,4 \mu\text{l}$ abpipettiert und in eine auf 38°C erwärmte Messkammer des Typs „Leja-4“ (Fa. Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) überführt. Die Messung erfolgte ca. 15-30 Sekunden nach vollständiger Verteilung der Probe in der Kammer entlang der Kammermittellinie.

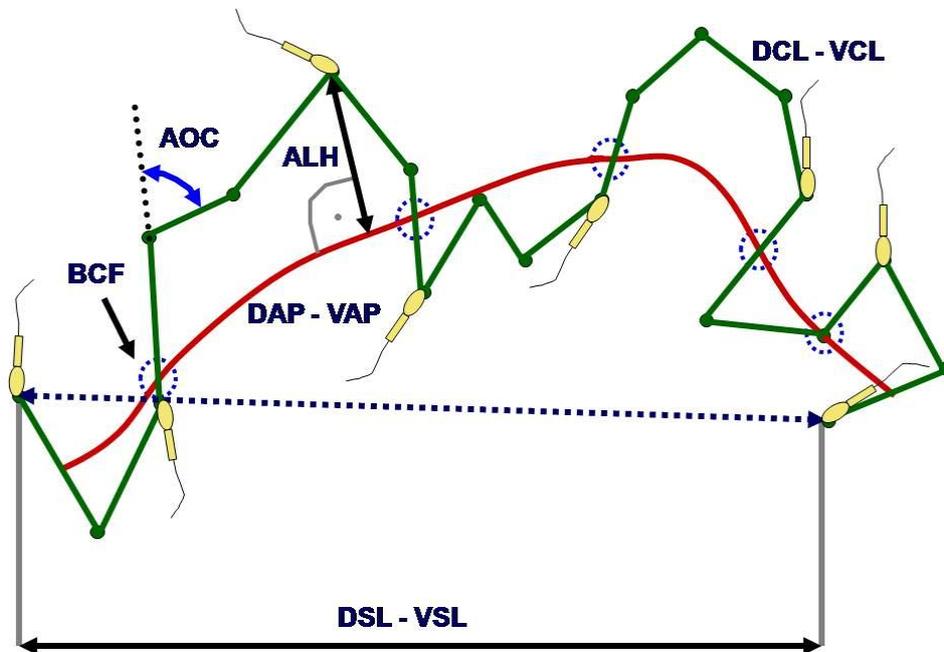


Abbildung 5: Schematisierte Darstellung der Bewegungsparameter ALH (amplitude of lateral head displacement - Amplitude der Kopfauslenkung), AOC (average orientation change of the head - Auslenkungswinkel), DAP (distance average path - Gemittelte Bahn), DCL (distance curved line - tatsächlich zurückgelegte Strecke), DSL (distance straight line - linearisierte Strecke), VAP (velocity average path - Geschwindigkeit der geglätteten Bahn), VCL (velocity curved line - Spurgeschwindigkeit) und VSL (velocity straight line - Geschwindigkeit der linearen Strecke), modifiziert nach Fa. Minitüb (2009).

3.6 Durchflusszytometrische Untersuchung

Mit Hilfe von Fluorochromen können sowohl physiologische als auch pathologische Merkmale und Vorgänge an Spermien visualisiert werden [130, 136, 158]. Fluoreszenzmarker binden an Zellstrukturen der Spermien und ermöglichen so Aussagen über die Integrität von Zellkompartimenten.

Die Untersuchung der gefärbten Spermien erfolgte an einem Durchflusszytometer (particle analysing system – PAS) der Fa. Partec (Münster, Deutschland). Dieses Gerät ist mit einem Argon-Ionen-Laser (200 mW, 488 nm) ausgestattet (Abbildung 6).

Mittels der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden zum einen der Akrosom- und Membranstatus (**Assay A**) und zum anderen die Mitochondrienaktivität (**Assay B**) und Vitalität der Spermien ermittelt (Tabelle 8).

3.6.1 Übersicht der eingesetzten Fluorochrome

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Propidiumjodid (PI, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Fluorescein-isothiocyanat-gekoppeltes (FITC) Peanut Agglutinin (PNA, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und *Pisum Sativum* Agglutinin (PSA, Fa. Sigma) sowie Rhodamin-123 (R123, Fa. Sigma) verwendet (Tabelle 7).

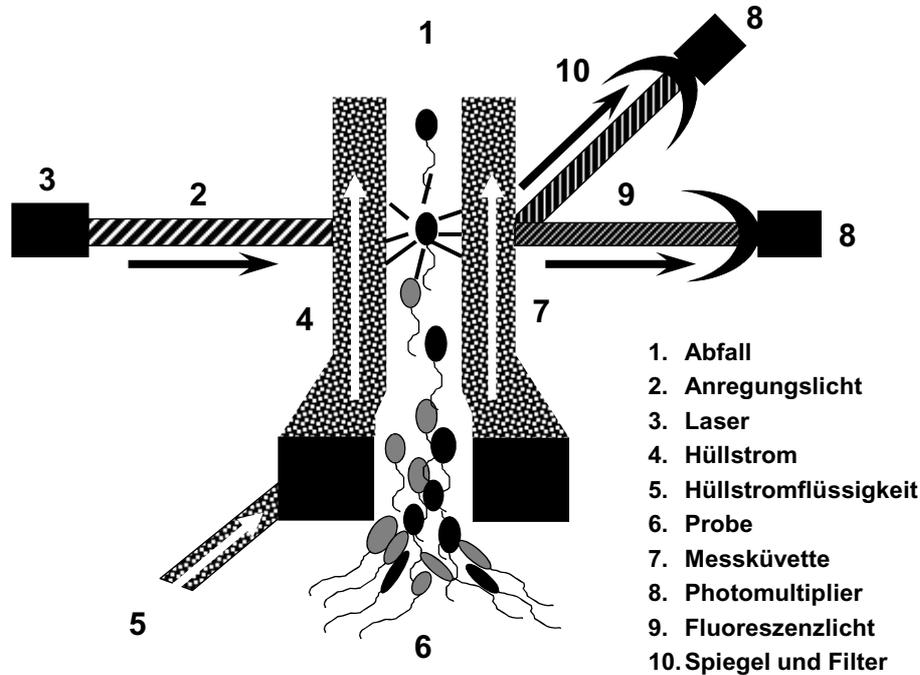


Abbildung 6: Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers nach Fa. Partec, verändert

PI ist ein membranimpermeabler Farbstoff, der zwischen den Basenpaaren der DNA interkaliert. Der Farbstoff wird in der Regel von lebenden Spermien mit intakter Plasmamembran ausgeschlossen. An Spermien mit defekter Plasmamembran („tote Spermien“) dringt der Farbstoff häufig am Übergang zwischen Spermienkopf und Mittelstück in das Spermium ein. Das Emissionsmaximum beträgt 620 nm und liegt im Bereich des roten Lichtes.

FITC ist ein Fluorochrom mit einem Emissionsmaximum bei 518 nm im Bereich des grünen Lichtes. Der Farbstoff ist sehr gut wasserlöslich und wurde kovalent an die Lektine PNA und PSA gekoppelt. PI wurde mit FITC-PSA und/oder FITC-PNA als Doppelfärbung verwendet, um die Plasmamembranintegrität bei akrosomintakten und -defekten Spermien darzustellen.

PNA bindet selektiv an β -D-Galaktose-Reste der äußeren akrosomalen Membran [37, 57, 70]. Eine positive PNA-Färbung geht nicht unbedingt mit einer positiven PI-Färbung einher.

PSA bindet an Strukturen des Akrosominhalts, den α -Methyl-Mannose-Resten. Eine PSA-Markierung charakterisiert ein akrosomreagiertes bzw. -defektes Spermium [33, 107]. PSA ermöglicht eine weitere Differenzierung, auch wenn die äußere akrosomale Membran nicht mehr vorhanden ist. Beide Lektine binden nicht an Spermien mit intakter Plasmamembran. Da die Membran „toter Spermien“ durch degenerative Vorgänge mit der Zeit permeabel wird, färben sich deren Akrosomen teilweise ebenfalls an. Um solch ein falsch positives Ergebnis zu vermeiden, ist es zweckmäßig, eine Doppelfärbung mit PI durchzuführen, die eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Spermien möglich macht [162].

R123 ist ein kationisch geladener Fluoreszenzfarbstoff, der in den Mitochondrien vitaler Spermien akkumuliert und dann grünes Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von 530 nm emittiert [22, 56, 76, 103, 123, 124, 136, 144, 189, 235, 251, 259, 355].

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Marker: Molekulargewicht in Dalton (MW), Absorptionsmaxima (λ_{abs}), Emissionsmaxima (λ_{em}); Desoxyribonukleinsäure (DNA), äußere Akrosomenmembran (äAM)

Marker	Bindung	MW [Da]	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	Stammlösung [mg/ml]
PI	DNA	668	535	620	1
FITC-PSA	akrosomaler Inhalt	49x10 ³	494	518	1
FITC-PNA	äAM	110x10 ³	494	518	1
R123	Mitochondrien	381	488	530	0,05

3.6.2 Durchführung und Auswertung der Messung

Die Daten wurden mit dem Programm Flomax Software Version 2.0 ausgewertet und Ergebnisse für Einzelparameter als Histogramm und für Kombinationen zweier Parameter als Punktwolken (Dotplot) abgeleitet. Für die Bestimmung wurden die unterschiedlichen Spermaproben bei 38 °C wie in Tabelle 8 angegeben und entsprechend der Probenzahl zeitlich gestaffelt verdünnt. PNA- bzw. PSA-Stammlösungen wurden vor der Versuchsmessung 1:10 bzw. 1:2 mit pNaCl nachverdünnt. Direkt vor der Durchführung der durchflusszytometrischen Messung wurden 10 μ l Probe in 2 ml sterilfiltrierte pNaCl-Lösung von 38 °C gegeben und gleichmäßig resuspendiert. Bei den Messungen kamen der FL-1 Filter (TK500/TK560: BP 500-560 nm, EM 520 DF50) für die grüne und der FL-3 Filter (TK560/TK610: LP>610 nm, RG 630) für die rote Fluoreszenz zum Einsatz.

Tabelle 8: Messprotokoll für die durchflusszytometrische Untersuchung (Assay A: Detektion des Akrosom- und Membranstatus; Assay B: Detektion der Mitochondrienaktivität)

Assay	0,5% Formol-pNaCl [μ l]	Sperma in BTS [μ l]	FITC-PNA [μ l-min]	FITC-PSA [μ l-min]	PI [μ l-min]	Rh-123 [μ l-min]	messen in pNaCl [μ l]
A	125	375	12,5-10	2,5-10	5-5	-	10
B	-	250	-	-	2,5-20	1-20	10

Bei einer Messgeschwindigkeit von 100 bis 150 Zellen pro Sekunde wurden 15.000 Spermien erfasst. Nach der Analyse der Spermienpopulationen im Streulicht und Übertragung auf das Zwei-Parameter-Fluoreszenzdiagramm wurden für den **Assay A** vier Spermien-subpopulationen mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften klassifiziert (Tabelle 9). Anschließend wurden die prozentualen Anteile der Quadranten Q2 und Q4 (Spermien mit Membran- und/oder Akrosomenschädigung) bzw. Q1, Q2 und Q4 (Gesamtheit der geschädigten Spermien) addiert (Abbildung 7).

Im **Assay B** (Tabelle 8) wurden Spermien mit einem intakten Mitochondrienpotential R123 markiert und durch Doppelfärbung mit PI prozentuale Anteile der plasmamembranintakten und mitochondrienaktiven Spermien-subpopulationen klassifiziert (Abbildung 8). Weiterhin wurden die Fluoreszenzintensitäten ermittelt, die eine zusätzliche quantitative Aussage zur Aktivität der Mitochondrien pro Zelle gestatten [203].

Tabelle 9: Klassifizierung der Spermienpopulationen in den einzelnen Quadranten nach ihren Fluoreszenzeigenschaften

Quadrant	Fluoreszenz	Beschreibung
Q1	PI(+); PNA(-); PSA(-)	Spermien mit Plasmamembranschäden und intakten Akrosomen (oder kompletter Akrosomenverlust)
Q2	PI(+); PNA(+/-); PSA(+/-)	Spermien mit Plasmamembranschäden und Akrosomendefekten
Q3	PI(-); PNA(-); PSA(-)	vitale, plasmamembranintakte Spermien mit intakten Akrosomen
Q4	PI(-); PNA(+/-);PSA (+/-)	vitale, plasmamembranintakte Spermien mit geschädigten Akrosomen

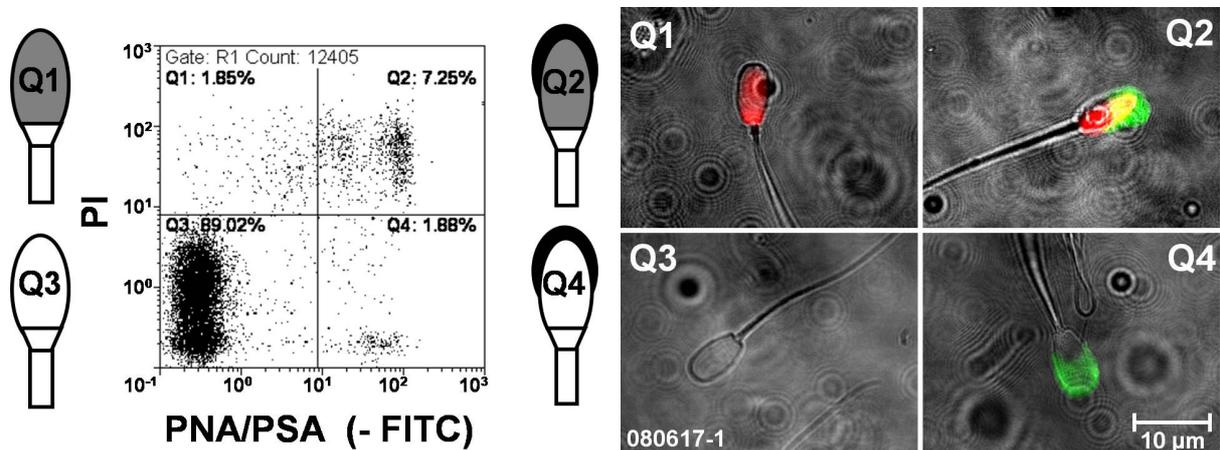


Abbildung 7: Dotplot der vier Eberspermienpopulationen nach FITC-PNA/PSA und PI-Färbung (Q1: Spermien mit Plasmamembranschäden und intakten Akrosomen; Q2: Spermien mit Plasmamembranschäden und Akrosomendefekten; Q3: vitale, plasmamembranintakte Spermien mit intakten Akrosomen; Q4: vitale, plasmamembranintakte Spermien mit geschädigten Akrosomen) und dazugehörige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Eberspermien mit typischem Bindungsmuster aus den vier Quadranten (Überlagerung aus DIC, grünem und rotem Fluoreszenzkanal).

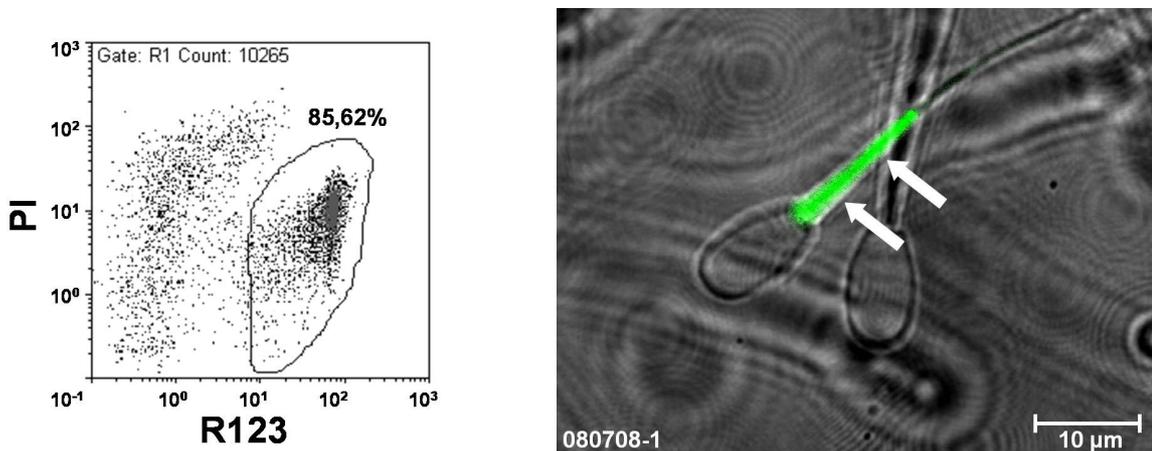


Abbildung 8: Dotplot einer Eberspermienpopulation nach R123-/PI-Färbung (ungefähr 86% der Eberspermien sind R123-gefärbt) und entsprechende fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines R123-gefärbten Eberspermiums mit charakteristischem Bindungsmuster (Überlagerung aus DIC und grünem Fluoreszenzkanal).

3.7 Mikrobiologische Untersuchung

Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden am Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW, Abteilung Bakteriologie) durchgeführt. Für die Bestimmung der Lebendkeimzahl (Kap. 4.1) wurde von den verschiedenen Spermaproben eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:100.000 erstellt. Aus jeder Verdünnung wurden jeweils zwei Nähragarplatten mit je 100 µl Probe beimpft (Plattenverdünnung 10^{-2} bis 10^{-6}), bei 37 °C inkubiert und die Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien nach 12 und 48 Stunden ausgezählt. Im Anschluss erfolgte die Berechnung des gewichteten Mittelwertes in Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter (KbE ml^{-1}).

Zur Untersuchung des Keimspektrums (Kap. 4.1 und 4.3) wurden eine Columbia-Agarplatte (5% Schafblut, Fa. Oxoid, Wesel, Deutschland), eine Gassner-Agarplatte (Fa. Oxoid) und eine McConkey-Agarplatte (Fa. Oxoid) mit je 50 µl der unverdünnten Proben beimpft und bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde ein Röhrchen Nährbouillon mit 50 µl unverdünnter Probe beimpft und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung der Platten erfolgte nach 24 und 48 Stunden.

Alle gewachsenen Bakterienkolonien wurden dokumentiert und von den relevanten Keimen Reinkulturen auf Columbia-Agar und Gassner-Agar angelegt. Im Fall einer nach 24 Stunden unbewachsenen Platte wurde die Trübung der Nährbouillon überprüft und im positiven Fall eine Impföse hiervon auf Columbia-Agar und Gassner-Agar ausgestrichen und bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Die Bestimmung der Bakterienarten erfolgte nach Gramfärbung, Katalase- und Oxidasetest und mittels handelsüblicher biochemischer Verfahren (API, Biomérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich).

Für die Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC, Kap. 4.1) wurde das Standardverfahren CLSI M31-A2 nach „Clinical Laboratory and Standards Institute“ (CLSI) unter Verwendung von Mueller-Hinton-II-Bouillon (MHII, kationenausgeglichen, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) angewandt [378]. Die in Tabelle 10 dargestellten Referenz-, Labor- und Wildtypstämme wurden auf die Wirksamkeit der antimikrobiellen Peptide untersucht.

Die Versuche wurden im Mikrodilutionsverfahren in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit einem Bakterien-Inokulum von $5 \times 10^5 \text{ KbE ml}^{-1}$ durchgeführt. Als Kontrollen wurden je Versuchsdurchlauf die zwei Referenzstämme mitgeführt. Zusätzlich wurden Reinheitskontrollen der zu testenden Bakterienkulturen durchgeführt und die Einsattdichte (KbE ml^{-1}) überprüft. Alle Peptide (Kap. 3.1, Tabelle 1) wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe von 0,05 µM bis 100 µM auf ihre Wirksamkeit gegenüber den ausgewählten Bakterienarten getestet.

Tabelle 10: Ausgewählte Bakterienspezies

Referenzstämme nach CLSI [378] M31-A2 (IZW)	Laborstämme (FMP)	Wildtypstämme (IZW, isoliert aus Ebersperma)
<i>St. aureus</i> (ATCC 29213)	<i>E. coli</i> DH5 alpha	<i>Enterobacter (E.) cloacae</i>
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>B. subtilis</i> DSM 347	<i>E. coli</i> , hämolysierend
		<i>K. pneumoniae ssp. pneumoniae</i>
		<i>Proteus myxofaciens</i>
		<i>Proteus vulgaris</i>

Je Platte wurde eine Wachstumskontrolle (Bakterienkultur ohne Peptidzusatz) und eine Medien-/Negativkontrolle (Medium ohne Bakterien) mitgeführt. Die beimpften Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und daraufhin die optische Dichte (OD) in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer (µQuant, Fa. BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 600 nm

gemessen. Alle Versuche wurden im dreifachen Ansatz getestet und dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Parallel zu diesen Versuchen wurden alle Tests im Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt.

Die Untersuchung auf mögliche Synergieeffekte bei gleichzeitiger Anwendung von Gentamicin und ausgewählten antimikrobiellen Peptiden (Kap. 4.3) erfolgte mit Hilfe der Referenzstämme nach CLSI M31-A2 und der Wildtypstämme (Tabelle 10). Bei jedem Versuch wurde die Bestimmung der MIC für Gentamicin als Kontrolle mitgeführt. Es wurde eine Gentamicin-Verdünnungsreihe von 2,2 μM bis 0,05 μM für die MHIB-Versuche hergestellt und mit der entsprechenden Peptidkonzentration versetzt.

Die Konzentrationen der Stammlösungen wurden so berechnet, dass nach Zugabe einer 150 μl Keimsuspension ($1,66 \times 10^6$ KbE ml^{-1}) pro Vertiefung auf der Mikrotiterplatte die gewünschte Konzentration von Gentamicin und Peptid vorlag. Für die vergleichende Untersuchung in LB-Medium wurde für die Referenzstämme eine Gentamicin-Verdünnungsreihe von 22 μM bis 1 μM und für die Wildtypstämme eine Gentamicin-Verdünnungsreihe von 500 μM bis 0,25 μM gewählt. Alle Testreihen im Synergieversuch wurden zweimal wiederholt.

3.8 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Das Bindungsverhalten fluoreszenzmarkierter Peptide an vitalen Eberspermien wurde mit Hilfe des Einsatzes eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops beurteilt [186, 391]. Da eine Fixierung der Spermien mit chemischen Agentien (z.B. Paraformaldehyd) zu Fehlinterpretationen führen könnte, wurden die Untersuchungen an unfixierten, lebenden Spermien durchgeführt [301].

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden 50 μl verdünntes Ebersperma (2×10^4 Spermien/ μl), 40 μl carboxyfluoreszeinmarkiertes Peptid (Tabelle 11), 0,7 μl Propidiumjodid (Stammlösung 1,5 mM PI, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 10 μl BTS (Fa. Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) für fünf Minuten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Überschüssiges Fluorochrom wurde in 900 μl BTS fünf Minuten bei 500 x g ausgewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 μl BTS resuspendiert. Fünfzehn Mikroliter der Spermiesuspension wurden dann auf einen vorgewärmten Objektträger in einer Spezialküvette aufgetragen und mit einem Deckgläschen ($\varnothing = 10$ mm) überschichtet.

Darauffolgend wurden die Proben bei 1000-facher Vergrößerung (Plan-Neofluar Objektiv 100 x/1,3 Öl) im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Fa. Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland) untersucht (Fluoreszenzanregung über einen Ar-Laser bei 488 nm und über einen HeNe-Laser bei 543 nm). Die Rotfluoreszenz wurde im 1. Kanal (Ch 1:LP650), die Grünfluoreszenz im 2. Kanal (Ch 2:BP505-530) detektiert.

Zur morphologischen Beurteilung stand differentieller Interferenzkontrast (DIC) zur Verfügung. Die Bilddateien wurden über das Bildverarbeitungsprogramm Zeiss LSM Image Browser 2005 ausgewertet.

Tabelle 11: Fluoreszenzmarkierte Peptide

Nomenklatur	Aminosäuresequenz	HPLC-Reinheit [%]	MW [g/mol]	Stammlösung [μM]
WW[F]	c(RRRWWK[FLUO])	>94	1327,5	50
WWW[F]	c(RRWWWK[FLUO])	>94	1357,5	50
[F]-M2a	[Fluo]-Magainin-2-amid	>82	2824,0	50

3.9 Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR)

3.9.1 Phospholipidanaloga

Die ESR-Spektroskopie ermöglichte eine Analyse der Peptid-Spermien-Wechselwirkung auf Membranebene. Die dafür benötigten Phospholipidanaloga wurden vom Institut für Biologie und Molekulare Biophysik der Humboldt Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

Alle Lipidanaloga waren in Chloroform/Methanol (1/1 vol/vol) gelöst und wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Spinmarkierte Lipidanaloga (SL, Abbildung 9) sind partiell wasserlöslich und liegen in wässriger Lösung im Monomer-Mizellen-Gleichgewicht vor. Sie enthalten in der β -Position des Glycerolgerüsts einen kurzkettigen Fettsäurerest (5C) mit einer paramagnetischen Doxyl-Gruppe [137, 148, 149, 199, 243, 245, 247, 281]:

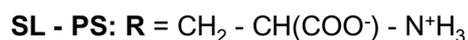
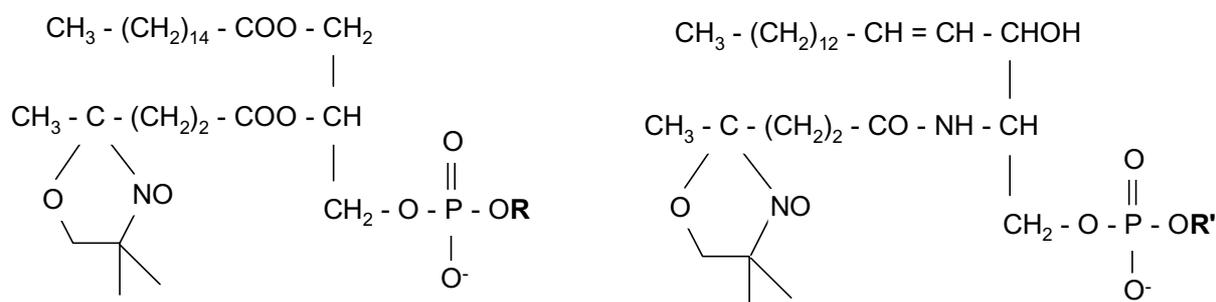


Abbildung 9: Spinmarkierte Phospholipidanaloga, synthetisiert nach Fellmann *et al.* (1994): In der β -Position des Glycerolgerüsts befindet sich ein kurzkettiger Fettsäurerest (5C) mit einer paramagnetischen Doxyl-Gruppe [108].

SL-PC = 1-Palmitoyl-2-(4-doxylnonyl)-phosphatidylcholin

SL-PS = 1-Palmitoyl-2-(4-doxylnonyl)-phosphatidylserin

SL-SM = N-(4-doxylnonyl)-*trans*-sphingeny-1-phosphocholin

3.9.2 Messung der ESR-Spektren

Der Einbau der Phospholipidanaloga in die Spermienmembran erfolgte bei Raumtemperatur [182]. Das molare Verhältnis von spinmarkierte Lipidanaloga zu endogenem Membranphospholipid wurde so eingestellt, dass ein Labelanteil von 6 mol% erhalten wurde [227, 244]. Ein spontaner Einbau der Spinlabel war deutlich an der Form der ESR-Spektren erkennbar (isotrop: wässrige Lösung mit freien Monomeren, anisotrop: eingebaut in Eberspermien, Abbildung 10).

Zur Aufzeichnung der Membranspektren wurden die markierten Spermisuspensionen in eine ESR-Kapillare überführt und am Spektrometer detektiert (Spektrometer: Bruker ECS 106, Karlsruhe, Deutschland; Modulation: 2G; Leistung: 20 mW; 4-fach Akkumulation der Spektren).

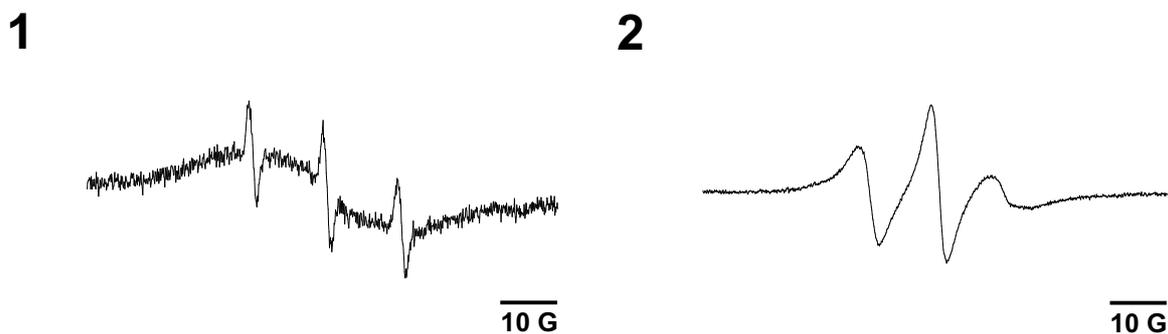


Abbildung 10: ESR-Spektrum von SL-PC bei 16 °C (Modulation: 2 G, Leistung: 20 mW)
(1) in BTS - die drei schmalen Linien entsprechen dem Monomerensignal, die breite Linie den in Mizellen organisierten Analoga und
(2) nach Einbau in die Spermienzellmembran.

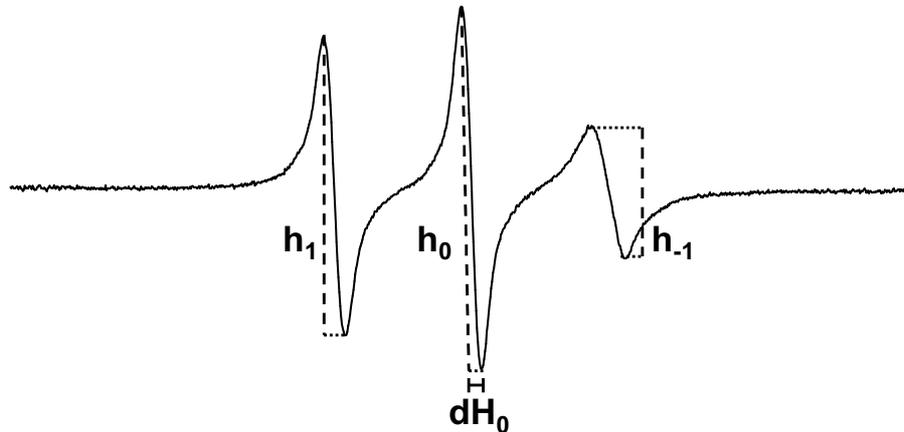
Nach einer 24-stündigen Lagerung des Eberspermas wurde über eine zweimalige Zentrifugation (Eppendorf 5403, sechs Minuten 750 x g und sechs Minuten 1000 x g, 22 °C) ein Spermienpellet von ca. $2,4 \times 10^8$ Spermien in 150 μ l BTS (Fa. Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) erzeugt. Ein Aliquot des jeweiligen Phospholipidlabels (18 μ l, 1 mM) wurde in ein Glasgefäß pipettiert und unter Stickstoff getrocknet, mit 50 μ l BTS aufgefüllt, gevortext und auf Eiswasser gestellt. 50 μ l der Spermien suspension wurden dann mit 10 μ l Label (SL-PC, SL-PS und SL-SM) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 1 ml BTS resuspendiert und anschließend nochmals zentrifugiert (sechs Minuten, 1000 x g), um den nicht eingebauten Label zu entfernen [245]. Das resultierende Spermien sediment wurde dann in 25 μ l BTS gelöst und mit je 5 μ l der Peptidstammlösungen eines Vertreters der Hexapeptide (WFW) und der Magainine (MK5E) inkubiert.

Als Kontrollproben wurden (i) das Spermienpellet und BTS (30 μ l) mit und ohne Gentamicin, (ii) die Labelsuspension ohne Zellen und mit Peptiden (55 μ l BTS, 5 μ l Label, 5 μ l Peptid) und (iii) 60 μ l BTS und 5 μ l Label genutzt. Gemessen wurden die Proben bei 16 °C, 22 °C und 38 °C.

3.9.3 Bestimmung der Korrelationszeit (τ_c)

Das ESR-Spektrum der in die Membran eingebauten SL-Lipide spiegelt die Beweglichkeit des Doxyl-Radikals in der jeweiligen Umgebung wider. Die Korrelationszeit (τ_c) wurde in Annäherung an ein isotropes System als empirisches Maß für die Bewegungsfreiheit und Rotationsgeschwindigkeit des Labels aus den Membranspektren berechnet (Abbildung 11). Eine geringe Korrelationszeit entspricht einer größeren Fluidität in der unmittelbaren Nachbarschaft des Markers (Mikrofluidität).

Um den durch zelluläre Komponenten reduzierten Label zu reoxidieren, wurden die Spermien suspensionen mit Kalium-Hexacyanoferrat ($K_3Fe(CN)_6$, Endkonzentration 10 mM, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versetzt [237, 319].



Gleichung 1:

$$\tau_c = 6,5 \times 10^{-10} \times dH_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right) \quad [\text{ns}]$$

$$dH_0 - \text{Linienbreite der Mittelfeldlinie} \quad [\text{Gauss}]$$

Abbildung 11: ESR-Spektrum eines SL-Phospholipidmarkers in der Spermienmembran. In Annäherung an ein isotropes System kann nach Gleichung 1 aus folgenden Größen die Korrelationszeit (τ_c) berechnet werden:

**dH_0 -Linienbreite der Mittelfeldlinie [Gauss]
 h_0, h_{-1} -Peakintensitäten bei mittlerem und hohem Feld**

3.10 Statistische Auswertung

Die Dateneingabe und -organisation erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office 2004, Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die Auswertung der Daten wurde mit dem Statistikprogramm „Friedman, Quade and Page tests“ (Version 2009, Heribert Hofer, IZW, Berlin) durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit dem Grafikprogramm SigmaPlot 10 (Systat Software, Point Richmond, USA) erstellt.

In den Versuchen A (Kap. 4.1) und C (Kap. 4.3) wurde untersucht, ob sich die einzelnen Varianten der Peptidsupplementation nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung sowohl vom Standardverfahren BTS + 544 μM Gentamicin als auch untereinander spermatologisch unterschieden. Dazu wurde separat zu jedem Zeitpunkt eine nichtparametrische Analyse nach *Friedman* ($p \leq 0,05$; zweiseitig) durchgeführt. *A posteriori* folgten paarweise multiple Vergleiche nach dem Verfahren von *Conover* [63]. Im Versuch B (Kap. 4.2) wurden die Effekte der Supplementation mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen nichtparametrisch nach *Friedman* ($p \leq 0,05$; zweiseitig) analysiert. *A posteriori* wurde mit dem „Page Test“ für geordnete Varianten auf eine Tendenz infolge steigender Peptidkonzentrationen getestet [63]. Die Ergebnisse der spermatologischen Untersuchungen sind als Box-plots mit dem höchsten bzw. niedrigsten gemessenen Wert (Whisker), dem Interquartilbereich zwischen dem 1. und 3. Quartil (Box) und dem Medianwert dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in den Abbildungen nur die statistisch gesicherten Unterschiede zwischen den jeweiligen Varianten und dem Standardverfahren BTS + 544 μM Gentamicin aufgeführt. Auf signifikante Unterschiede der Varianten untereinander wird im Text verwiesen.

Für die statistische Überprüfung des Zusammenhangs zwischen mikroskopischer und durchflusszytometrischer Analyse wurde eine Korrelationsberechnung nach *Spearman* ($p \leq 0,05$; zweiseitig) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt einer AMP-Supplementierung gegenüber Gentamicin im Verlauf der Lagerung (Versuch A)

Zur Charakterisierung von Lagerungs- und Konzentrationseffekten wurden jeweils neun Ejakulate in einem „split-sample“-Verfahren mit den Hexapeptiden (A) WWW und WFW (V_{1-5}) und den Magainin-Derivaten (B) IWWTI-M2a und MK5E (V_{1-5}) aufbereitet (Kap. 3.2, Abbildung 4). Die Variante V_5 enthielt in beiden Peptidgruppen zusätzlich $0,5 \mu\text{M}$ Gentamicin. Die Konzentrationen der eingesetzten Peptide lagen im Bereich der einfachen und doppelten MIC. Die MIC wurde zuvor am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) an *E. coli* DH-5 α und *B. subtilis* DSM 347 bestimmt.

Es wurde geprüft, ob sich die einzelnen Versuchsvarianten V_{1-5} nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung signifikant ($p \leq 0,05$; zweiseitig) von der Kontrollvariante (K: BTS + $544 \mu\text{M}$ Gentamicin) unterschieden. Des Weiteren wurden die Proben hinsichtlich des Keimspektrums untersucht. Eine Resistenzprüfung an ausgewählten Keimen war Bestandteil der mikrobiologischen Untersuchung (Kap. 3.7, Tabelle 10).

Die Ergebnisse werden in nachstehender Reihenfolge dargestellt:

- pH-Wert,
- Akrosom- und Membranstatus,
- Spermienmotilität,
- quantitativer, qualitativer Keimgehalt und Resistenzprüfung an ausgewählten Keimen.

4.1.1 Auswirkungen eines Peptidzusatzes auf den pH-Wert des Verdünners

Der BTS-Standardverdünner (K: BTS + $544 \mu\text{M}$ Gentamicin) hatte nach 12 Stunden Lagerung einen pH-Wert von etwa pH 7,2 bis 7,3 erreicht, nach 48 Stunden Lagerung einen pH-Wert von pH 7,3 bis 7,5 und nach 96 Stunden Lagerung einen pH-Wert von pH 7,4 bis 7,6. In den Versuchsgruppen mit Peptidzusatz lag der pH-Wert zwischen pH 7,3 und 7,4 nach 12-stündiger Lagerung, zwischen pH 7,3 und 7,6 nach 48-stündiger Lagerung und zwischen pH 7,4 und 7,7 nach 96-stündiger Lagerung (Abbildung 12).

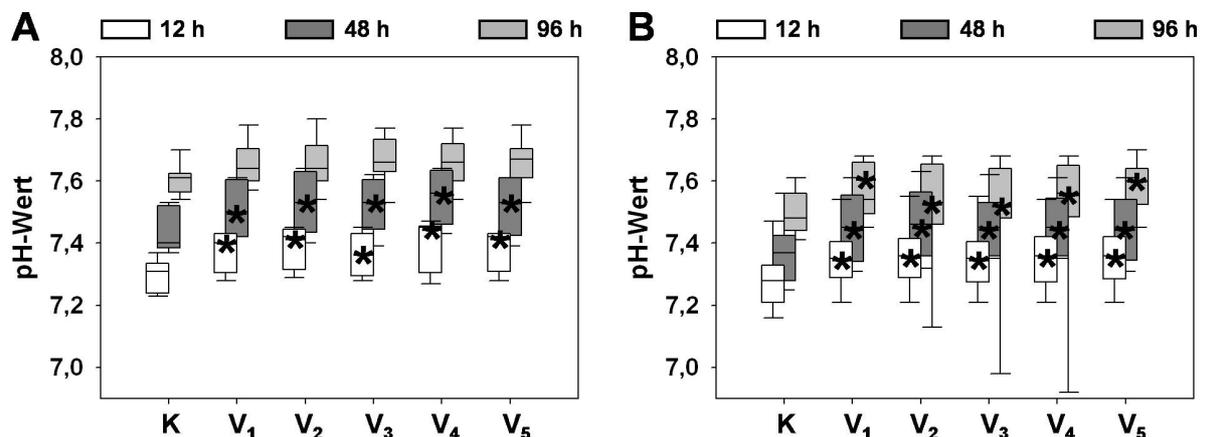


Abbildung 12: pH-Werte nach Zusatz der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B).
* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + $544 \mu\text{M}$ Gentamicin)

Die Varianten mit Hexapeptidzusatz führten signifikant nach 12 Stunden ($p < 0,001$) und 48 Stunden ($p \leq 0,003$) Lagerung zu einem Anstieg des pH-Wertes (Abbildung 12A). Bei den

Magainin-Derivaten zeigten sich analoge pH-Wert-Differenzen zum Kontrollmedium, signifikant nach 12 Stunden ($p < 0,001$), 48 Stunden ($p < 0,001$) und 96 Stunden ($p \leq 0,01$) Lagerung (Abbildung 12B). Auffällig war ein pH-Wert-Abfall bei einem Teil der Ejakulate in Anwesenheit der Magaininvarianten V_2 , V_3 und V_4 .

4.1.2 Auswirkungen eines Peptidzusatzes auf den Akrosom- und Membranstatus

Die Befruchtungskompetenz eines Spermiums ist wesentlich von der morphologischen und funktionellen Integrität der Plasmamembran und den darunter liegenden akrosomalen Membranen abhängig. Dabei reagieren die Membranen sehr empfindlich auf Milieuveränderungen und Konservierungseinflüsse [376].

Zur simultanen Darstellung des Membran- und Akrosomstatus wurden die Fluoreszenzfarbstoffe PI, FITC-PNA und FITC-PSA eingesetzt (Kap. 3.6, Assay A). Zum Zweck der Optimierung des durchflusszytometrischen Verfahrens wurden in einem Vorversuch 15 verschiedene Fluorochromkonzentrationen überprüft. Zusätzlich wurden Inkubationszeiten und -medien mit dem Ziel variiert, eine möglichst große Übereinstimmung zwischen den Messungen der mikroskopischen und durchflusszytometrischen Analyse zu erreichen (nicht dargestellt).

Der Zusammenhang zwischen mikroskopisch ausgezählten (Kap. 3.3) und durchflusszytometrisch durch Quadrantensummutation (Kap. 3.6.2) bestimmten Prozentsätzen akrosomgeschädigter Eberspermien ist in Abbildung 13 dargestellt.

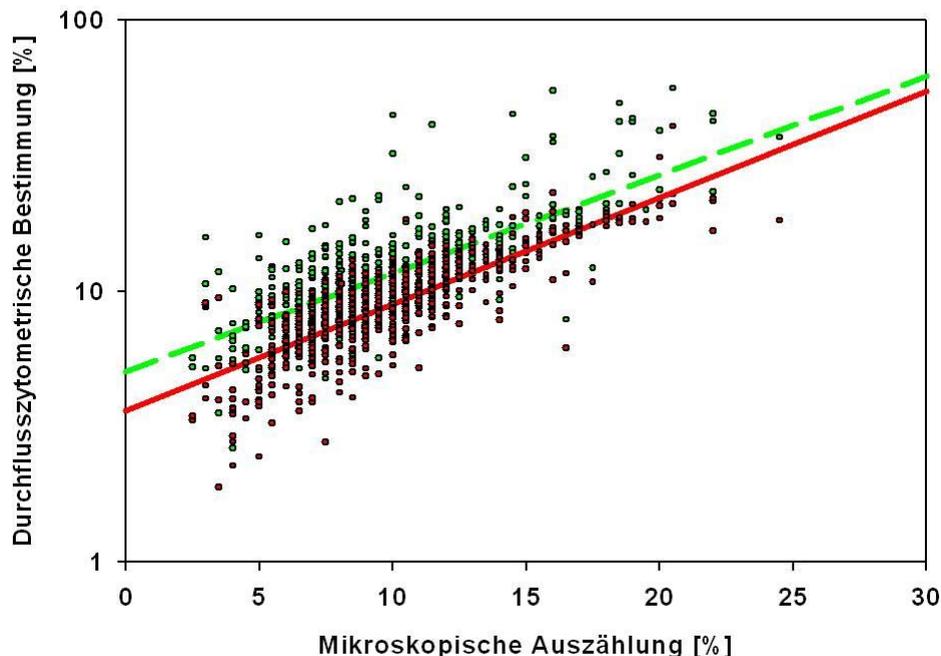


Abbildung 13: Korrelation zwischen mikroskopisch ausgezählten und durchflusszytometrisch durch Quadrantensummutation bestimmten Prozentsätzen membran- und akrosomgeschädigter Eberspermien.

— $r = 0,84$; $R^2 = 0,70$; $p < 0,0001$; $n = 642$

- - - $r = 0,69$; $R^2 = 0,47$; $p < 0,0001$; $n = 642$

● geschädigte Kopfkappen vs. Quadrant 2/4

● geschädigte Kopfkappen vs. Quadrant 1/2/4

Für die Korrelationsberechnung wurden zum einen die prozentualen Anteile der Spermienpopulationen der Quadranten eins, zwei und vier zum anderen die prozentualen

Anteile der Spermienpopulationen der Quadranten zwei und vier addiert und der mikroskopischen Analyse von Kopfkappendefekten gegenübergestellt. Die aus den Kurven für die Eber mikroskopisch bestimmten Anteile von Spermien mit Kopfkappendefekten zeigten eine höhere Korrelation mit den durchflusszytometrisch ermittelten Werten der Summation der Quadranten zwei und vier ($r = 0,84$; $p < 0,0001$; $n = 642$). Daraus folgt, dass es möglich war, aus einer Drei-Parameter-Analyse durchflusszytometrischer Daten mit anschließender Summation der prozentualen Anteile der Spermienpopulationen aus den Quadranten zwei und vier die Anteile akrosomgeschädigter Spermien verlässlich zu ermitteln. Insgesamt gestattete die Dreifachfärbung PI, FITC-PNA und FITC-PSA mit nachfolgender Summation der Prozentsätze von Spermien aus den Quadranten eins, zwei und vier eine zuverlässige Differenzierung vitaler, plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom von jenen mit Akrosomdefekten und von plasmamembrandefekten („toten“) Spermien.

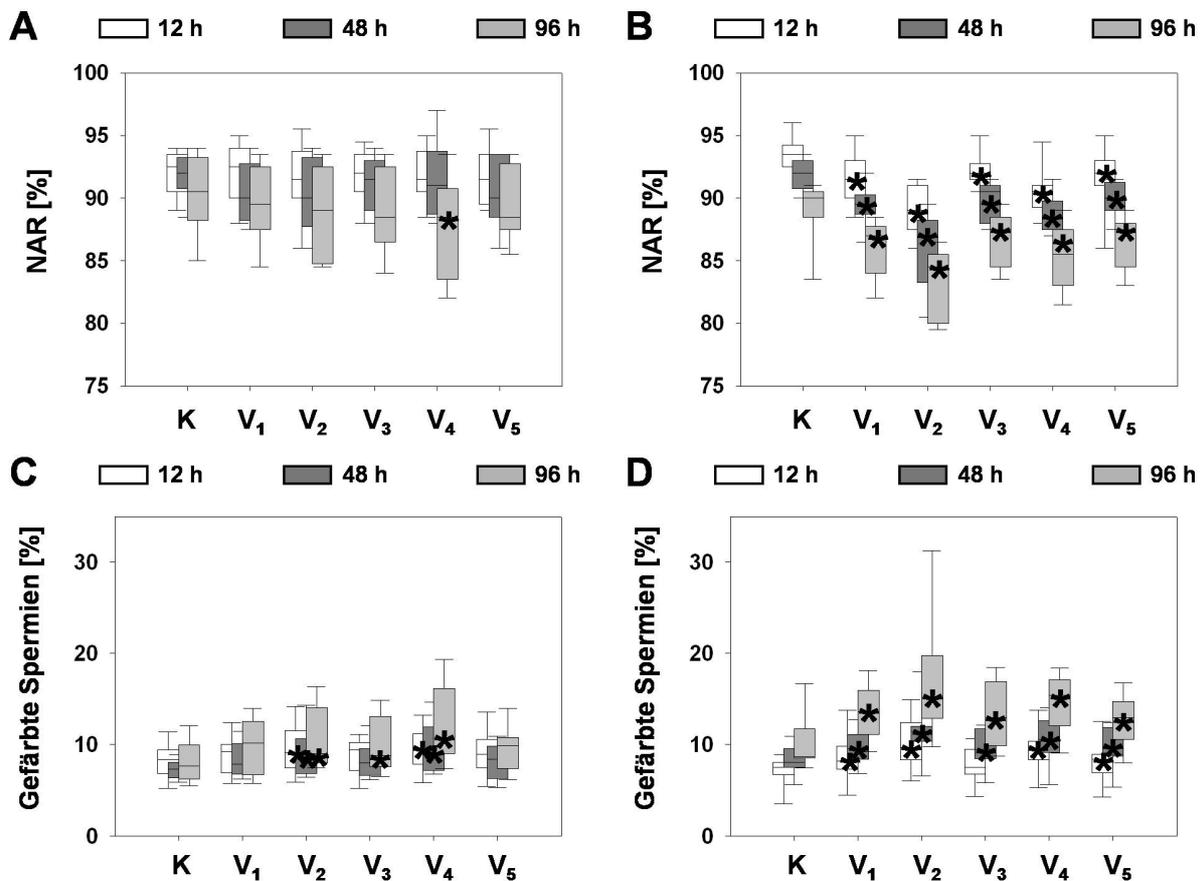


Abbildung 14: Anteile von Spermien mit „Normalem Apikalen Rand“ (NAR) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B) und Anteile PI, FITC-PNA und/oder FITC-PSA-gefärbter Spermien nach Zusatz der Hexapeptide (C) und Magainin-Derivate (D). Der Anteil gefärbter Spermien errechnete sich im durchflusszytometrischen Verfahren aus der Summation der Quadranten eins, zwei und vier (Kap. 3.6.2, Assay A).
* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Der Anteil von Spermien mit „Normalem Apikalen Rand“ (NAR) unterschied sich in Gegenwart der Hexapeptide nicht signifikant ($p > 0,05$) von der Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin). Eine Ausnahme bildete die Variante V₄ nach 96 Stunden Lagerung ($p < 0,001$). Der Einfluss der Konzentration wurde auch bei der Variante V₂ deutlich (Abbildung 14A). Anders verhielt es sich nach Zusatz der Magainin-Derivate V₁₋₅, die konzentrationsabhängig zu einer signifikanten ($p \leq 0,006$) Verringerung des Anteils an Spermien mit NAR führten (Abbildung 14B). Der Effekt verstärkte sich schrittweise mit zunehmender Lagerungsdauer.

Die durchflusszytometrischen Daten bestätigten, dass in der Hexapeptidgruppe (A) mit den getesteten Konzentrationen im Vergleich zu den Magainin-Derivaten (B) insgesamt geringere Membran- und Akrosomschäden verzeichnet werden konnten (Abbildung 14C und D). Dennoch wurde das Signifikanzniveau vor allem mit steigender Konzentration bei den Varianten V_2 und V_4 nach 12 und 48 Stunden Lagerung ($p < 0,001$), aber auch mit steigender Lagerungsdauer bei den Varianten V_2 , V_3 und V_4 nach 96-stündiger Lagerung ($p \leq 0,002$) in der Hexapeptidgruppe erreicht. Bei den Magainin-Derivaten führten mit Ausnahme von V_3 nach 12 Stunden Lagerung alle Varianten zu einer signifikanten Erhöhung membran- und akrosomgeschädigter Spermien ($p < 0,001$). IVWTI-M2a (V_2) hatte dabei den stärksten Einfluss nach 96-stündiger Lagerung (Abbildung 14D).

4.1.3 Auswirkungen eines Peptidzusatzes auf die Spermienmotilität

Die Spermienmotilität, die Fähigkeit zur Eigenbeweglichkeit der Spermien, ist eine wesentliche Voraussetzung für die Befruchtung. Die Motilitätsanalyse liefert Hinweise auf den ungestörten Ablauf verschiedener Stoffwechselfvorgänge. Es muss allerdings beachtet werden, dass zur Befruchtung weitere Eigenschaften essentiell sind, die mit der Motilitätsanalyse nicht erfasst werden können [339].

Zu keinem Zeitpunkt der Lagerung war ein signifikanter ($p > 0,05$) Peptideffekt auf den Prozentsatz motiler Spermien (MOT P) ableitbar (Abbildung 15). Im Verlauf der Lagerung und während des Thermoresistenztestes (TRT) sank der Anteil motiler Spermien in allen Proben. Besonders deutlich war die Abnahme der Motilität im TRT nach 300 Minuten Inkubation bei 38 °C. Die Differenzen zwischen den 30 und 300-min-Werten (Persistenzen) waren zwischen beiden Peptidgruppen unterschiedlich. Geringere Differenzen zwischen Testbeginn und Testende im TRT zeigten die Hexapeptidvarianten V_{1-4} (Abbildung 15A). Die WFW-Varianten waren sehr stabil und erzielten nach 300 Minuten Inkubation im Vergleich zur Kontrolle die höchsten Motilitätswerte. Der Unterschied von V_3 und V_4 zur Kontrolle betrug im Mittel ungefähr 15%. Die Magaininvarianten V_1 und V_2 erreichten nach 300-minütiger Inkubation im TRT dagegen die niedrigsten Motilitätswerte (Abbildung 15B). Die hohe Stabilität in den Motilitätswerten nach 300 Minuten Inkubation war im Vergleich zur Hexapeptidgruppe nicht gegeben.

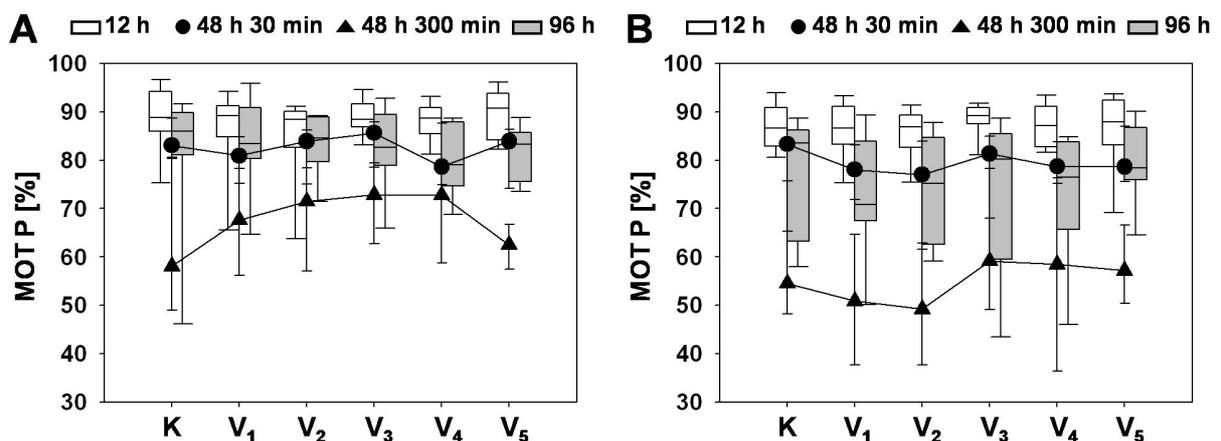


Abbildung 15: Anteile motiler Spermien (MOT P) nach Hexapeptid-(A) und Magaininzusatz (B).

Der Anteil progressiv motiler (vorwärts beweglicher) Spermien (PROG P) blieb durch den Zusatz der Peptide unbeeinflusst, wenngleich mit längerer Lagerung oder Inkubation im TRT eine Verminderung des Anteils sichtbar wurde (Abbildung 16). Auffällig waren wiederum höhere Persistenzen der Hexapeptidvarianten im TRT nach 300-minütiger Inkubation bei einem Teil der Ejakulate (V_{1-4} , Abbildung 16A). Den höchsten Anteil progressiv motiler Spermien erzielten in Analogie zur Gesamtmotilität die Hexapeptidvarianten V_2 ($p = 0,036$),

V_3 ($p = 0,009$) und V_4 ($p = 0,002$). Entsprechend dem Anteil motiler Spermien (MOT P) im TRT nach 300-minütiger Inkubation reduzierte sich der Anteil vorwärts beweglicher Spermien (PROG P) stärker bei den Magaininvarianten (Abbildung 16B).

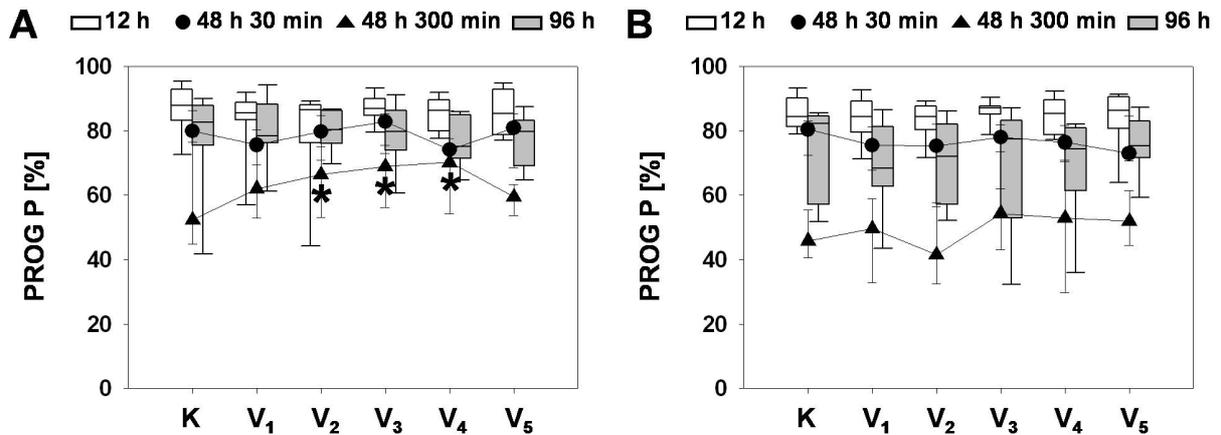


Abbildung 16: Anteile progressiv motiler Spermien (PROG P) nach Hexapeptid- (A) und Magainin-Inkubation (B).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Auf die durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeit progressiv motiler Spermien (PROG VAP) wirkten sich die Peptide mit Ausnahme des 300-min-Wertes im TRT negativ gegenüber der Kontrollprobe aus, was sich sowohl bei den Hexapeptiden V_{1-5} ($p \leq 0,01$) als auch bei den Magainin-Derivaten V_{1-5} ($p \leq 0,01$) in signifikanten Unterschieden ausdrückte (Abbildung 17A und B). Wiederholt wird der Einfluss des eingesetzten Peptids, aber auch der Wirkkonzentration deutlich. Im TRT stieg nach 300-minütiger Inkubation bei 38 °C die Geschwindigkeit in der Hexapeptid-Gruppe im Vergleich zu den Basiswerten nach 30 Minuten an. Der signifikante Geschwindigkeitsabfall von WWW ($p \leq 0,003$) und WFW ($p \leq 0,01$) wurde durch eine längere Inkubation im TRT kompensiert und erzielte am Endpunkt des TRTs mindestens das Niveau des Kontrollverdünners (Abbildung 17A). Diese Reversibilität konnte bei den Magainin-Derivaten nicht beobachtet werden. Anstiege der 300-min-Werte im Vergleich zu den 30-min-Werten wurden nicht verzeichnet (Abbildung 17B).

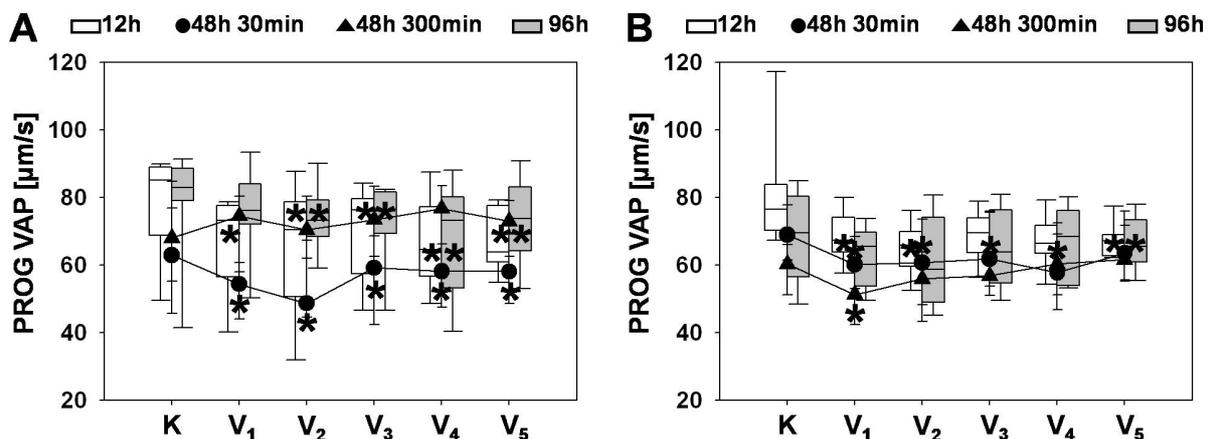


Abbildung 17: Durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeiten [$\mu\text{m s}^{-1}$] progressiv motiler Spermien (PROG VAP) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Im Streckenparameter PROG DAP der Hexapeptidgruppe V_{1-5} wurden adäquat zur Geschwindigkeitsvariablen PROG VAP signifikant ($p \leq 0,01$) geringere Strecken pro

Zeiteinheit nach 12 und 96 Stunden Lagerung bzw. im TRT nach 30-minütiger Inkubation zurückgelegt (Abbildung 18A).

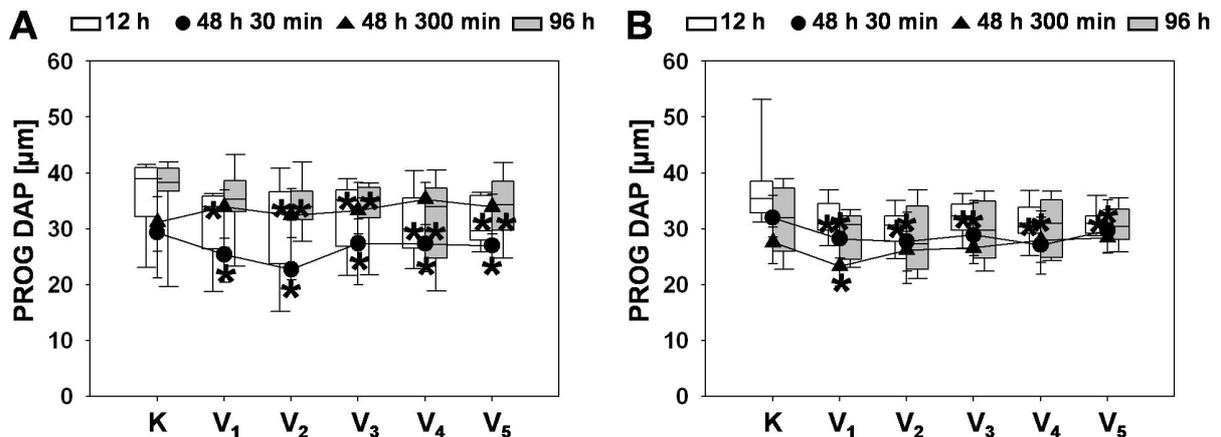


Abbildung 18: Gemittelte Bahnen [µm] progressiv motiler Spermien (PROG DAP) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 µM Gentamicin)

Sowohl im Geschwindigkeitsparameter PROG VAP als auch im Streckenparameter PROG DAP zeigten die Hexapeptidvarianten im TRT nach 300-minütiger Inkubation eine Inversion. Eine längere Inkubation bei 38 °C im TRT führte, verglichen mit den Werten zu Testbeginn, zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit und damit der zurückgelegten Strecke pro Zeiteinheit. Am Endpunkt des TRTs wurde das Niveau des Kontrollverdünners erzielt. Eine Umkehrung des Effektes durch die längere Inkubation bei 38 °C war bei den Magainin-Derivaten wiederholt nicht zu erkennen. Die Versuchsvarianten V₁₋₅ der Magainin-Derivate legten im Vergleich zum Kontrollmedium (K: BTS + 544 µM Gentamicin) nach 12 Stunden Lagerung ($p \leq 0,03$) und im TRT nach 30-minütiger Inkubation ($p < 0,001$) signifikant kürzere Strecken pro Zeiteinheit zurück (Abbildung 18B).

Die Prüfung der Linearität der progressiv beweglichen Spermien (PROG LIN) ergab für die Hexapeptidvarianten V₂₋₅ signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede (Abbildung 19A). Insbesondere WFW-angereicherte Spermien bewegten sich in Abhängigkeit von der Konzentration nach 12 Stunden und 96 Stunden Lagerung signifikant ($p < 0,001$) geradliniger, wobei der Effekt am Ende des TRTs nicht mehr beobachtet werden konnte. Die längere Inkubation nach 30 und 300 Minuten bei 38 °C überlagerte den Einfluss der Hexapeptide auf die Linearität. Die 30-minütige Inkubation im TRT hatte insgesamt den stärksten Einfluss auf die Geradlinigkeit der Spermienbewegung. Im weiteren Verlauf des TRTs nahm die Linearität in beiden Peptidgruppen wieder ab. Die Magainin-Derivate hatten keinen linearisierenden Effekt auf die Spermienbewegung (Abbildung 19B).

Mit abnehmender Amplitude (Schwingungsbreite) steigt in der Regel die Linearität der Bewegungsbahn. Gegenläufig zu den Ergebnissen der linearen Bewegung reduzierten die Hexapeptidvarianten V₁₋₅ signifikant nach 12 und 96 Stunden Lagerung ($p \leq 0,01$), aber auch nach 48 Stunden im TRT zu Testbeginn ($p \leq 0,005$) die Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung der progressiv motilen Spermien (Abbildung 20A). Die WFW-Variante V₄ hatte dabei den größten Effekt auf die Lateralamplitude nach 12 und 96 Stunden Lagerung ($p < 0,001$).

Die Magainin-Derivate V₁₋₅ zeigten einen ähnlichen Einfluss in abgeschwächter Form nach 12 Stunden Lagerung und im TRT nach 30-minütiger Inkubation bei 38 °C (Abbildung 20B).

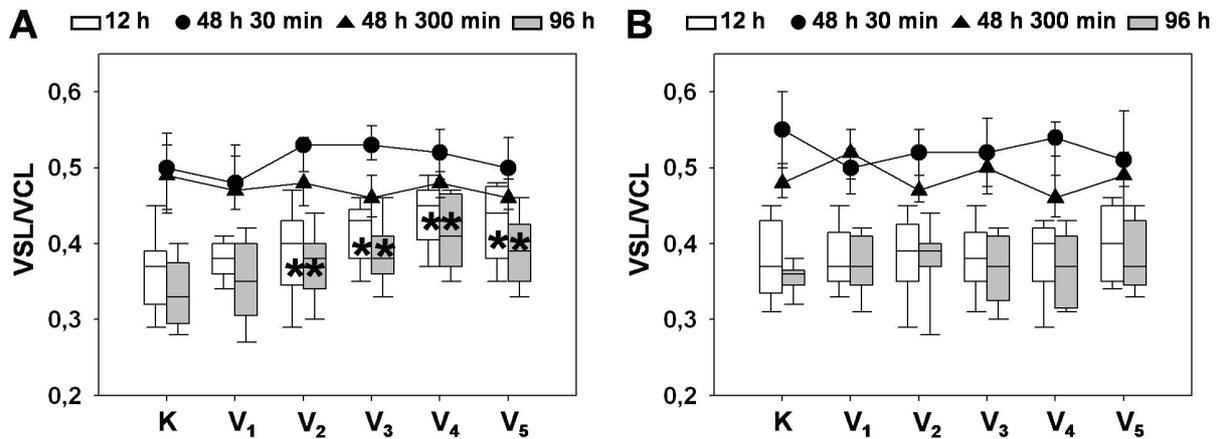


Abbildung 19: Linearitäten progressiv motiler Spermien (PROG LIN) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B). Die Linearität errechnete sich aus dem Quotienten VSL/VCL.

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Insgesamt führte die 30-minütige Inkubation bei 38 °C im TRT in beiden Peptidgruppen zu einer signifikanten ($p \leq 0,05$) Amplitudenabnahme. Wiederum konnte der Effekt am Ende des TRTs nicht mehr beobachtet werden. Im Vergleich zum Kontrollverdünner (K: BTS + 544 μM Gentamicin) stieg die Kopfauslenkungsamplitude bei den Hexapeptidvarianten stärker als bei den Magainin-Derivaten.

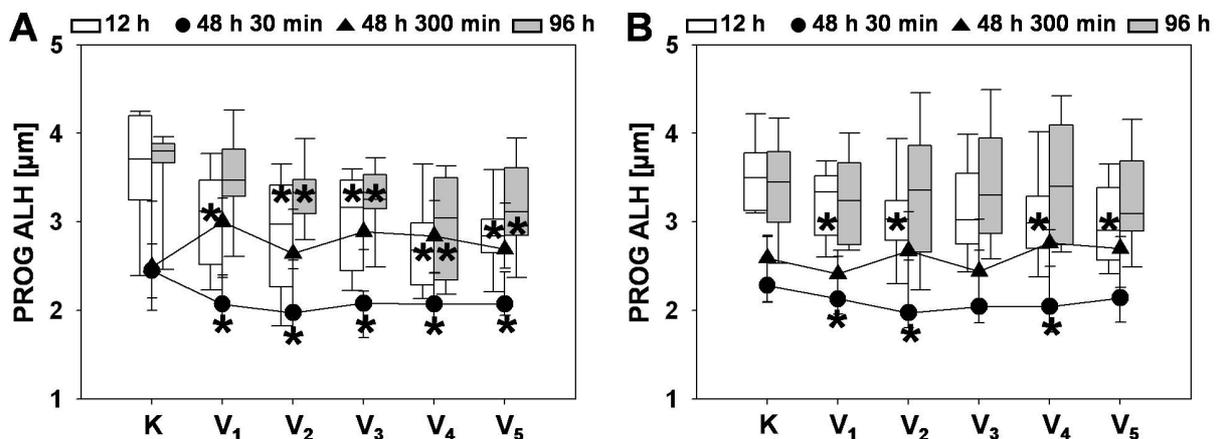


Abbildung 20: Kopfauslenkungsamplituden [μm] progressiv motiler Spermien (PROG ALH) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Ein Vergleich der Schlagfrequenzen (PROG BCF) zwischen Kontroll- und Versuchsvarianten ließ in beiden Peptidgruppen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede vor allem im TRT zu Testbeginn erkennen (Abbildung 21). Die Hexapeptidvarianten V₁₋₅ ($p \leq 0,005$) und die Magainin-Derivate V₁ ($p < 0,001$), V₂ ($p < 0,001$) und V₄ ($p = 0,004$) führten zu einer signifikanten Verringerung der Schlagfrequenz.

Bei den Hexapeptidvarianten V₁₋₅ stieg (Abbildung 21A), bei den Magainin-Derivaten sank die Schlagfrequenz am Ende des TRTs nach 300-minütiger Inkubation bei 38 °C (Abbildung 21B).

Analog zu den Ergebnissen der Linearität (PROG LIN, Abbildung 19) und Kopfauslenkungsamplitude (PROG ALH, Abbildung 20) der progressiv motilen Spermien stieg der Anteil der linear progressiv beweglichen Spermien (LIN P) in der Hexapeptidgruppe V₃₋₅ nach 12 Stunden Lagerung ($p < 0,001$) und 96 Stunden Lagerung ($p \leq 0,005$) signifikant an (Abbildung 22A).

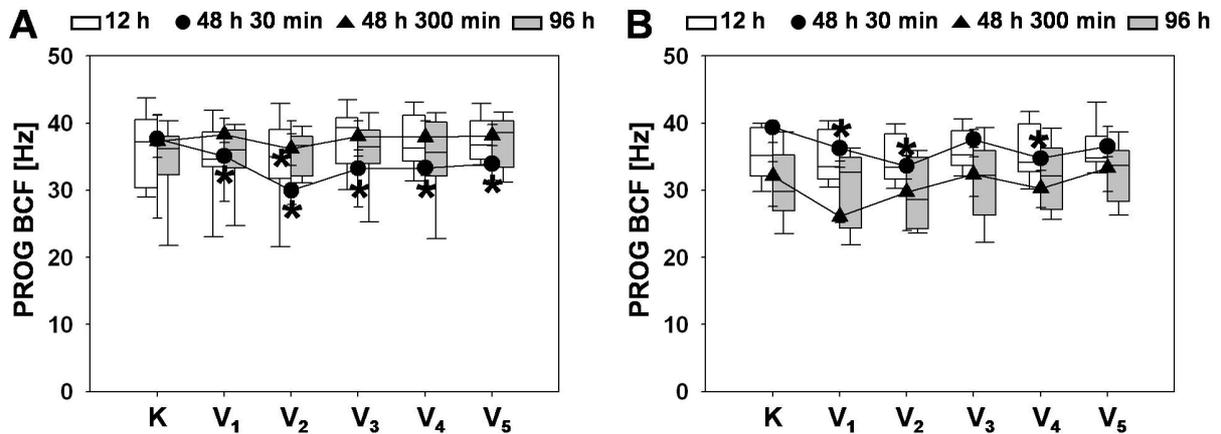


Abbildung 21: Schlagfrequenzen [Hz] progressiv motiler Spermien (PROG BCF) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Im TRT nach 30-minütiger Inkubation war bei den Magainin-Derivaten V₁₋₅ dieser Effekt erneut gegensätzlich ausgeprägt. Der Anteil der linear progressiv beweglichen Spermien (LIN P) fiel signifikant ($p \leq 0,005$) ab (Abbildung 22B).

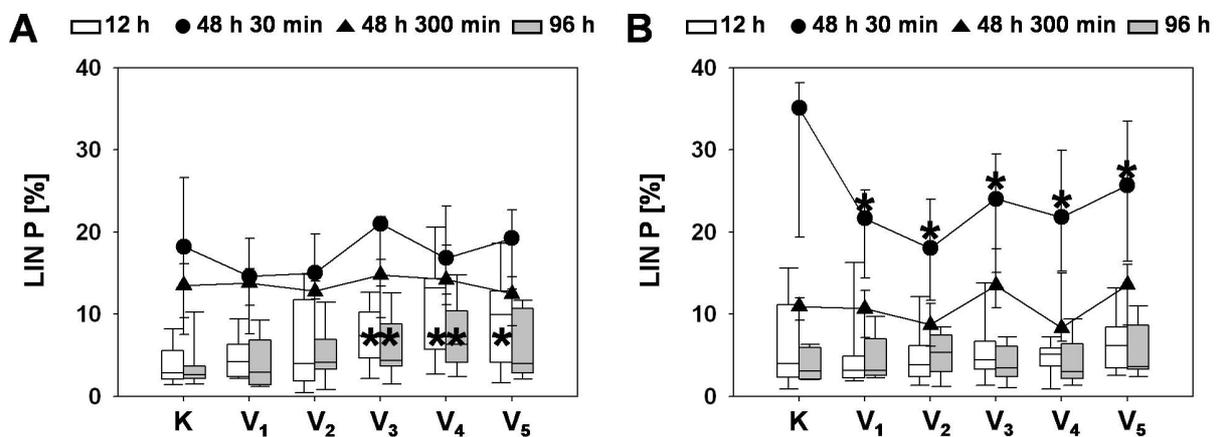


Abbildung 22: Anteile linear progressiv motiler Spermien (LIN P) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Der Parameter LIN VAP charakterisiert die durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeit der geradlinig beweglichen Spermienpopulation. Gegenläufig zu den Ergebnissen der durchschnittlichen Gesamtgeschwindigkeit progressiv motiler Spermien (PROG VAP, Abbildung 17) erhöhte sich die Geschwindigkeit der geradlinig beweglichen Spermienpopulation in beiden Peptidgruppen (Abbildung 23). Überwiegend WFW (V₃₋₄), zum Teil WWW (V₅) und MK5E (V₃₋₄) erhöhten signifikant ($p \leq 0,03$) die durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeit der linear progressiv motilen Spermien nach 12 und 96 Stunden Lagerung (Abbildung 23A und B). Im TRT zu Testbeginn verringerte sich die Geschwindigkeit für die Hexapeptidvarianten V₁ ($p = 0,014$) und V₂ ($p = 0,019$) bzw. für die Magaininvarianten V₁ ($p = 0,002$), V₂ ($p < 0,001$) und V₄ ($p = 0,008$) signifikant.

Die Durchschnittsgeschwindigkeit der geradlinig beweglichen Spermienpopulation der Hexapeptidgruppe erreichte nach 300-minütiger Inkubation im TRT mindestens Ausgangsniveau, während bei den Magainin-Derivaten die längere Inkubation nach 300 Minuten einen Geschwindigkeitsabfall verursachte (Abbildung 23B), der jedoch nur in einem Fall (V₁) signifikant war ($p = 0,01$).

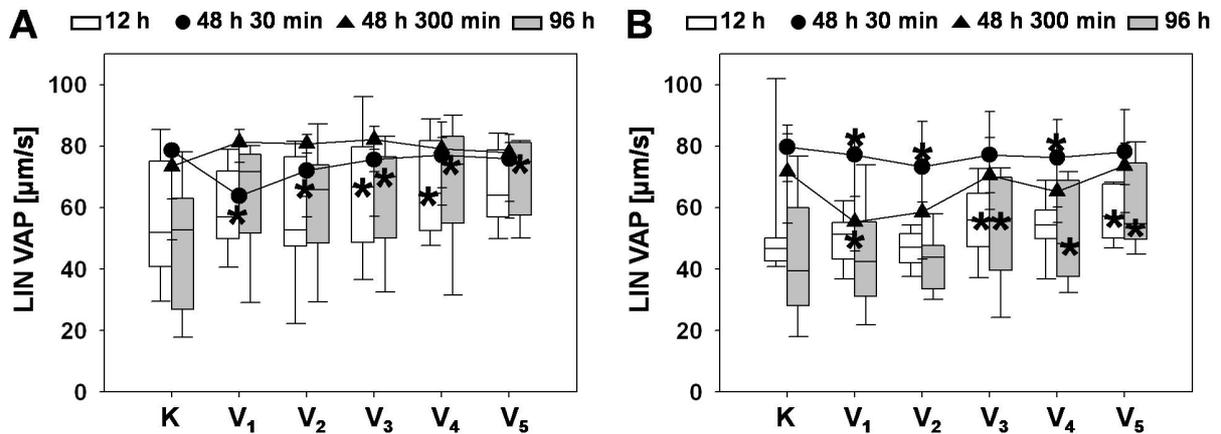


Abbildung 23: Durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeiten [$\mu\text{m s}^{-1}$] linear progressiv motiler Spermien (LIN VAP) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B). * kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Unter dem Einfluss der Hexapeptidvarianten V₂₋₅ sank der Anteil kreisbeweglicher Spermien (KREIS P) nach 12 Stunden ($p \leq 0,008$) und 96 Stunden ($p < 0,001$) Lagerung signifikant unter das Niveau des Kontrollverdünners (K: BTS + 544 μM Gentamicin, Abbildung 24A).

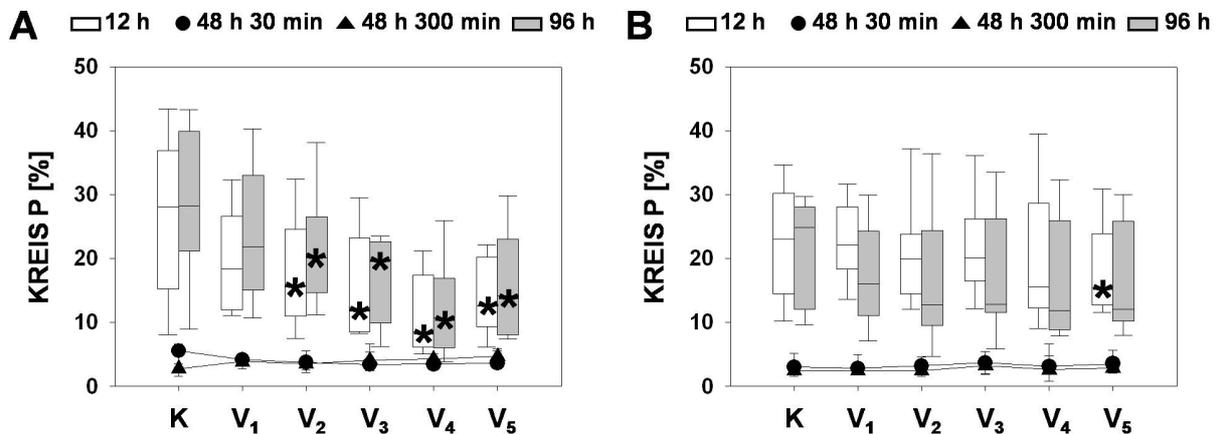


Abbildung 24: Anteile kreisbeweglicher Spermien (KREIS P) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B). * kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Bei den Magainin-Derivaten zeigte sich ein ausgeglichenes Motilitätsprofil der kreisbeweglichen Spermien. Nach 12 Stunden Lagerung erreichte nur die Variante V₅ Signifikanzniveau ($p = 0,025$). In höheren Konzentrationen, vor allem nach 96 Stunden Lagerung, konnte eine Verringerung im Anteil der kreisbeweglichen Spermien festgestellt werden (Abbildung 24B). Die längere Inkubation bei 38 °C im TRT dezimierte den Anteil kreisbeweglicher Spermien in beiden Peptidgruppen, so dass einheitlich in beiden Gruppen ein Niveau von ungefähr 5% erreicht wurde (Abbildung 24A und B). Die Unterschiede im hyperaktiven Motilitätsprofil (HYPER P) waren insbesondere in der Gruppe der Hexapeptide nach 12-stündiger Lagerung ($p \leq 0,02$) und nach 96-stündiger ($p \leq 0,008$) Lagerung signifikant (Abbildung 25A). Der Anteil hyperaktiv progressiv motiler Spermien lag für die Varianten V₂₋₅ deutlich unter dem Anteil des Kontrollmediums (K: BTS + 544 μM Gentamicin).

Bei den Magainin-Derivaten (Abbildung 25B) konnten Differenzen zum Kontrollverdünner statistisch nicht gesichert werden ($p > 0,05$). Die längere Inkubation im TRT nach 30 und 300 Minuten verringerte den Anteil hyperaktiv progressiv motiler Spermien in beiden Versuchsgruppen unter 1% (Abbildung 25).

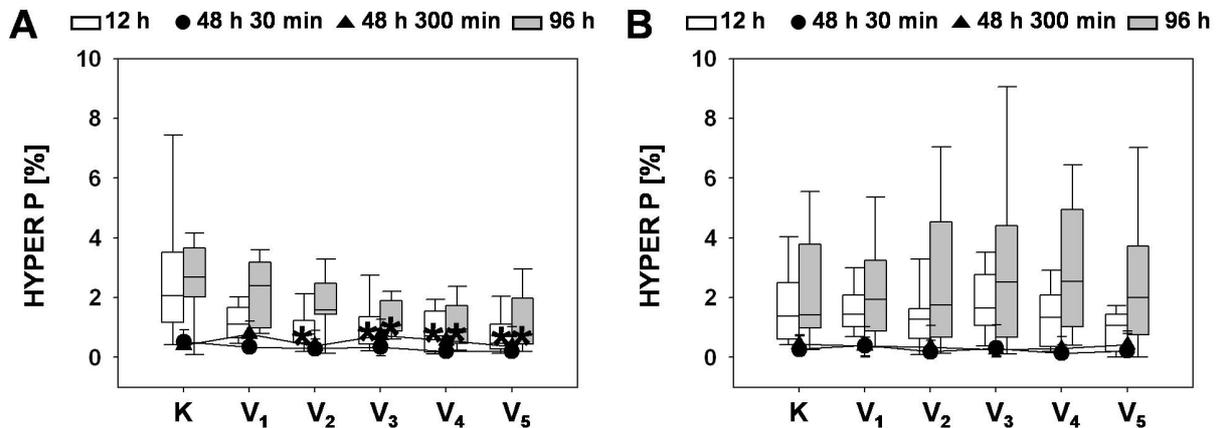


Abbildung 25: Anteile hyperaktiv progressiv motiler Spermien (HYPER P) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Der Anteil unbeweglicher Spermien (IMMOT P) war nach 12 Stunden Lagerung zwischen Kontroll- und den beiden Peptidgruppen ausgeglichen und stieg unabhängig von der Versuchsvariante während der Lagerungszeit nach 96 Stunden und eindeutig im TRT nach 300 Minuten an (Abbildung 26). Ein Hexapeptidzusatz (V₁₋₄) wirkte sich generell positiv auf die Spermienbewegung im TRT nach 300-minütiger Inkubation aus (Abbildung 26A). Den geringsten Anteil unbeweglicher Spermien am Endpunkt des TRTs verzeichnete die Hexapeptidvariante V₄ (WFW). Hohe Anteile unbeweglicher Spermien zeigten dagegen die Magainin-Derivate, darunter besonders die Varianten V₁ und V₂ im TRT nach 300 Minuten Inkubation (Abbildung 26B).

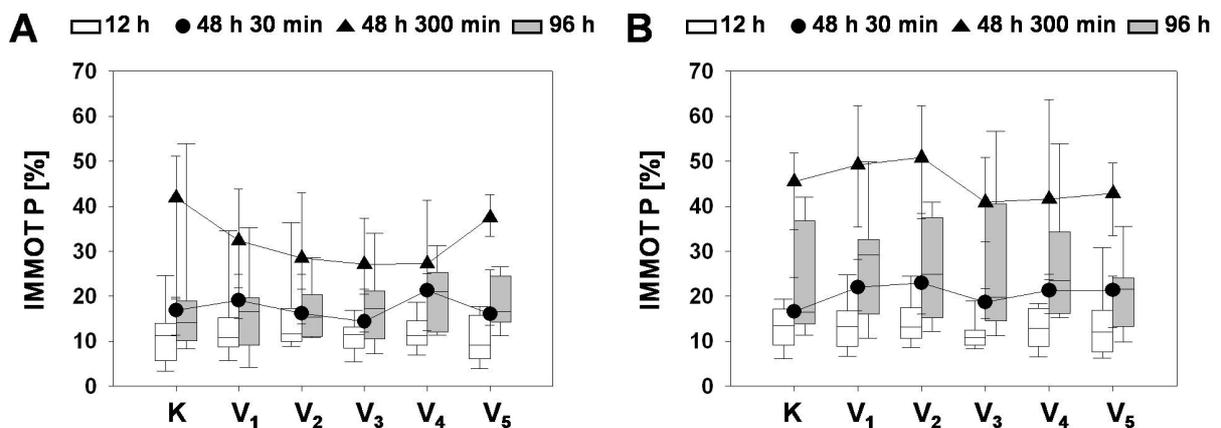


Abbildung 26: Anteile unbeweglicher Spermien (IMMOT P) in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass:

- die Motilität der Eberspermien peptid- und konzentrationsabhängig beeinflusst wurde,
- die Peptidvarianten gegenüber dem Standardverdünner BTS + 544 μM Gentamicin im Untersuchungszeitraum keinen signifikanten ($p > 0,05$) Einfluss auf den Prozentsatz motiler (MOT P) sowie progressiv motiler Spermien (PROG P) ausübten,
- die Hexapeptidvarianten hohe Persistenzen im Anteil progressiv motiler Spermien (PROG P) im TRT nach 300-minütiger Inkubation zeigten,
- die Hexapeptidvarianten, darunter besonders WFW, die Linearität (PROG LIN, LIN P) der Spermienbewegung stimulierten (den gleichen, jedoch stärker ausgeprägten Effekt bewirkte eine längere Inkubation der Spermien im TRT bei 38 °C),

- beide Peptidgruppen die Kopfauslenkungsamplitude und Schlagfrequenz beeinträchtigten,
- der Einfluss der Hexapeptidvarianten auf die Spermienmotilität eine Reversibilität zeigte,
- die Hexapeptidvarianten im Vergleich zu den Magainin-Derivaten geringere Motilitäts-einbußen verursachten und
- die Geschwindigkeits- und Streckenparameter (PROG VAP, PROG DAP) peptid- und konzentrationsabhängig teilweise negativ beeinträchtigt wurden.

4.1.4 Bestimmung der Lebendkeimzahl nach Zusatz verschiedener Peptide

Im Nativsperma lag die Lebendkeimzahl nach 12 Stunden Lagerung bei 10^2 - 10^5 KbE ml⁻¹, nach 48 Stunden zwischen 10^3 - 10^5 KbE ml⁻¹ und nach 96 Stunden stieg die Zahl auf mehr als 10^8 KbE ml⁻¹ an.

Die Untersuchung von Proben, die nach dem Standardverfahren mit BTS + 544 µM Gentamicin konserviert wurden, ergab nach 12 und 48 Stunden bei mehr als 30% der Proben kein Wachstum von Keimen. Ein Viertel der Proben waren nach 96 Stunden Lagerung keimfrei. Über die Hälfte der Proben zeigte nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung einen Keimgehalt von weniger als 10^2 KbE ml⁻¹. In weniger als 20% der Proben waren zu allen drei Zeitpunkten 10^3 KbE ml⁻¹ nachweisbar (Abbildung 27K).

Die beiden Hexapeptidvarianten WWW (V₁) und WFW (V₃) erzielten untereinander vergleichbare Ergebnisse. Unter Verwendung von WWW (V₁) lag die Keimzahl nach 12 und 48 Stunden Lagerung bei 30% der Proben in einem Bereich von $\leq 10^2$ KbE ml⁻¹ sowie nach 96 Stunden Lagerung bei 40% der untersuchten Proben unter 10^2 KbE ml⁻¹. Einen Bakteriengehalt von weniger als 10^3 KbE ml⁻¹ wiesen 60% bzw. 50% nach 12 und 48 Stunden auf, während nach 96 Stunden Lagerung 30% der geprüften Proben in diesem Bereich lagen (Abbildung 27A).

Die WFW-Variante V₃ ergab nach 12 und 48 Stunden Lagerung in jeweils 10% der Proben keinen Nachweis von Keimen. Über den gesamten Zeitraum gesehen, ergaben 20% nach 12 und 48 Stunden bzw. 30% der Proben nach 96 Stunden Lagerung einen Keimgehalt von $\leq 10^2$ KbE ml⁻¹. Die Hälfte der Proben wies nach 12 Stunden Lagerung $\leq 10^3$ KbE ml⁻¹ auf, ebenso 60% der Proben nach 48 und 40% nach 96 Stunden Lagerung (Abbildung 27A).

Für die Magaininabkömmlinge IVWTI-M2a (V₁) und MK5E (V₃) wurden nach 12 Stunden und für IVWTI-M2a auch nach 48 Stunden mit WWW und WFW vergleichbare Werte erzielt. Nach 96 Stunden Lagerung waren deutliche Unterschiede erkennbar. Hier stieg die Lebendkeimzahl in zwei Drittel der mit IVWTI-M2a und MK5E versetzten Proben auf bis zu 10^6 KbE ml⁻¹. Ein Drittel der mit MK5E (V₃) verdünnten Proben erreichte nach 96 Stunden Lagerung einen Wert von mehr als 10^6 KbE ml⁻¹ (Abbildung 27B).

Die Variante V₅ der Hexapeptidgruppe erbrachte nach 12 Stunden und auch nach 96 Stunden Lagerung Keimzahlen von $\leq 10^2$ KbE ml⁻¹ in 30% der Proben sowie nach 48 Stunden in 60% der untersuchten Proben. Zehn Prozent zeigten nach 48 Stunden Lagerung keinen Keimgehalt. Ein Keimgehalt von $\leq 10^3$ KbE ml⁻¹ wurde nach 12 Stunden bei 70%, nach 48 Stunden bei 30% und nach 96 Stunden Lagerung bei 60% der Proben festgestellt. Nur zehn Prozent hatten nach 96-stündiger Lagerung einen Keimgehalt von $\leq 10^4$ KbE ml⁻¹ (Abbildung 27A).

In der Magaininvariante V₅ wurde in einer Probe nach 12 Stunden Lagerung keine Keimbelastung nachgewiesen. Die Menge an Bakterien lag in 50% der Fälle nach 12 Stunden sowie in 17% nach 48 Stunden Lagerung unter 10^2 KbE ml⁻¹. Weniger als 10^3 KbE ml⁻¹ waren in 33% der Proben nach 12 und 96 Stunden, in 67% der Proben nach 48 Stunden Lagerung nachweisbar. Nach 48 Stunden Lagerung wurden in einer Probe und in zwei Proben nach 96 Stunden Lagerung $\leq 10^4$ KbE ml⁻¹ gefunden. Zwei weitere Proben wiesen nach 96-stündiger Lagerung mehr als 10^6 KbE ml⁻¹ auf (Abbildung 27B).

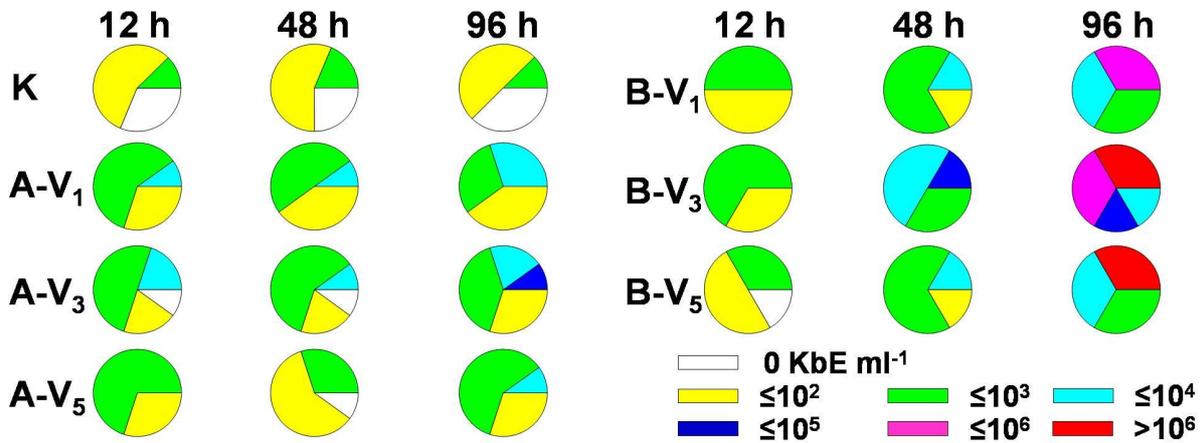


Abbildung 27: Lebendkeimzahlbestimmung [KbE ml⁻¹] im Sperm nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung in Gegenwart der Hexapeptide (A) und Magainin-Derivate (B).
 K: BTS + 544 µM Gentamicin
 A-V₁: BTS + 2 µM WWW
 A-V₃: BTS + 4 µM WFW
 A-V₅: BTS + 2 µM WWW + 0,5 µM Gentamicin
 B-V₁: BTS + 2,5 µM IVWTI-M2a
 B-V₃: BTS + 1 µM MK5E
 B-V₅: BTS + 1 µM MK5E + 0,5 µM Gentamicin

4.1.5 Untersuchungen des Keimspektrums nach Zusatz verschiedener Peptide

Bei der Analyse der verschiedenen Ejakulate (nativ, Standardverdünung, Peptidzubereitung) zeigte sich, dass der Keimgehalt und das Keimspektrum stark vom Einzeltier beeinflusst wurde. Aus dem Nativsperma wurden 20 Bakterienspezies isoliert. Fünfundfünfzig Prozent der isolierten Bakterien waren gramnegativ, wovon 73% den Enterobacteriaceae zugeordnet werden konnten. Der Anteil der „unspezifischen Keimflora“ machte einen Anteil von 45% aus (Abbildung 28). Insgesamt waren Enterobacteriaceae in 88% aller untersuchten Nativspermaproben nachweisbar. Fünfundsiebzig Prozent aller Ejakulate enthielten Bakterien der Gattung *Proteus*.

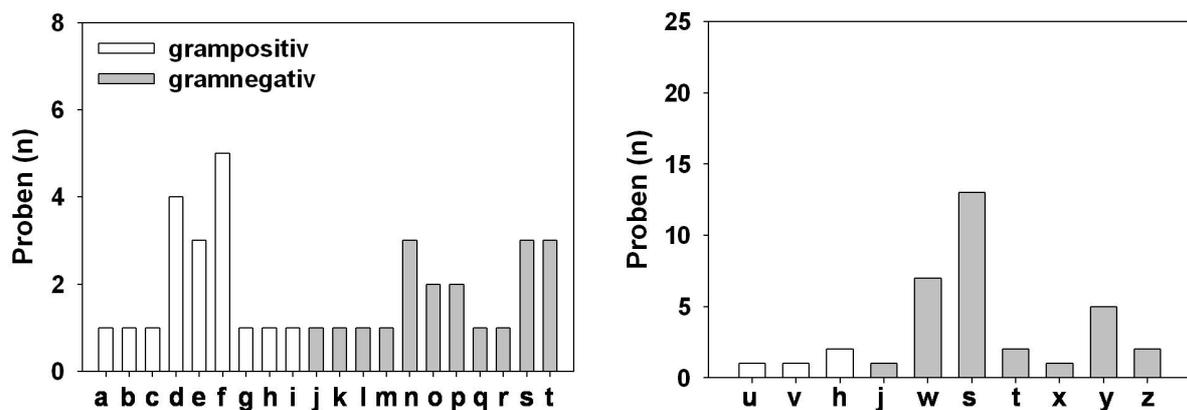


Abbildung 28: Links: Keimarten im Nativsperma aus zwei Besamungseberstationen (n=18), Rechts: Keimarten im Kontrollverdünner (K: BTS + 544 µM Gentamicin).
 a: *Staphylococcus capitis*; b: *Staphylococcus chromogenes*; c: *Staphylococcus cohnii* ssp. *cohnii*;
 d: *Staphylococcus hyicus*; e: *Staphylococcus xylosum*; f: *Corynebacterium striatum/lamycolatium*;
 g: *Corynebacterium glucuronolyticum-seminale*; h: *Corynebacterium* sp.; i: *Enterococcus durans*;
 j: *Citrobacter koseri*; k: *Enterobacter amnigenus*; l: *Enterobacter* sp.; m: *Rahnella aquatilis*;
 n: *Proteus mirabilis*; o: *Proteus myxofaciens*; p: *Proteus penneri*; q: *Proteus vulgaris*;
 r: *Morganella morganii*; s: *Ralstonia pickettii*; t: *Chryseobacterium indologenes*;
 u: *Staphylococcus caprae*; v: *Corynebacterium renale* group; w: *Klebsiella oxytoca*;
 x: *Pseudomonas aeruginosa*; y: *Pseudomonas fluorescenz*; z: *Stenotrophomonas maltophilia*

Aus den verdünnten Spermaproben der Kontrollvariante (K: BTS + 544 μM Gentamicin) konnten insgesamt zehn verschiedene Keimarten nachgewiesen werden. Der Anteil gramnegativer Bakterien betrug 70%. Zweiunddreißig Prozent gehörten zur Familie der Enterobacteriaceae. *Proteus* spp. wurden nicht gefunden (Abbildung 28).

Fünfzehn verschiedene Keime wurden aus den Peptidvarianten isoliert. Der Anteil gramnegativer Bakterien betrug mehr als 50%. Davon gehörten neun Arten zur Gruppe der Enterobacteriaceae. Alle Varianten der Peptidkonservierung enthielten bis zu vier verschiedene *Proteus*-Arten.

Ein weiterer gramnegativer und multiresistenter Keim, *Stenotrophomonas maltophilia*, war ungefähr in einem Drittel aller Peptidproben nachweisbar (Abbildung 29).

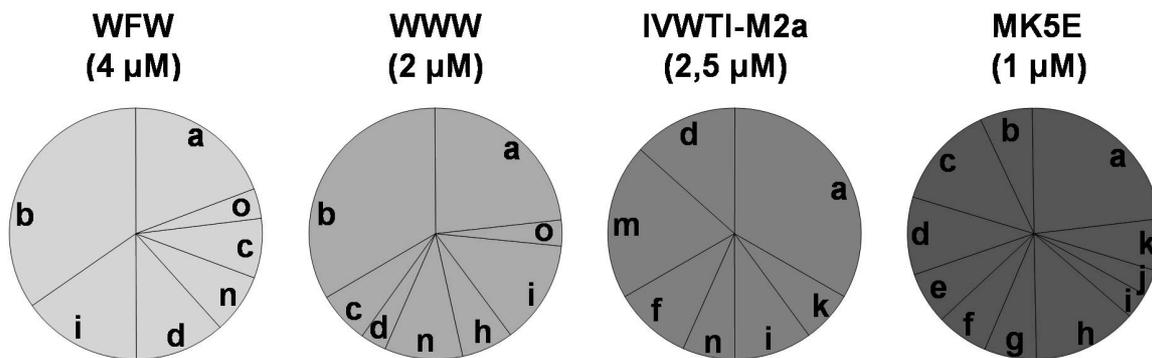


Abbildung 29: Keimspektrum der Hexapeptidvarianten (n=9) 4 μM WFW, 2 μM WWW und der Magainin-Derivate (n=9) 2,5 μM IVWTI-M2a und 1 μM MK5E.

a: unspezifische Mischflora; b: *Proteus mirabilis*; c: *Proteus vulgaris*; d: *Proteus penneri*; e: *Proteus* sp.; f: *Providencia alkalifaciens*; g: *Providencia rettgeri*; h: *Burkholderia cepacia*; i: *Stenotrophomonas maltophilia*; j: *Aeromonas hydrophila*; k: *Delftia acidovorans*; l: *Proteus myxofaciens*; m: *Serratia rubideia*; n: *Ralstonia pickettii*; o: *Vibrio metschnikovii*

4.1.6 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) an ausgewählten Bakterienstämmen

Alle Peptide wurden in den Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,3; 12,5; 25; 50 und 100 μM auf ihre Wirksamkeit gegenüber den ausgewählten Bakterienarten (Tabelle 9) sowohl in Mueller-Hinton-II-Bouillon (MHIIB, Standardverfahren, Tabelle 12) als auch im Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, Tabelle 13) getestet.

Im CLSI-Standardverfahren waren alle Keime, sofern MIC-Referenzbereiche zur Verfügung standen, gegenüber Gentamicin empfindlich. Vergleicht man die Ergebnisse in den zwei unterschiedlichen Nährmedien LB und MHIIB miteinander, wird deutlich, dass sich die MIC-Werte stark unterscheiden.

Für die Testsubstanz Gentamicin wurde die MIC im LB-Medium erst bei einer vielfach höheren Konzentration erreicht. Die MIC verringerte sich für die Peptide unter Verwendung des LB-Mediums mit Ausnahme der Wirkung auf die *Proteus*-Stämme sowie *St. aureus*, *K. pneumoniae* (WFW), *Enterobacter cloacae* (WFW) und *E. coli* ATCC 25922 (WWW und WFW).

Bezogen auf die Referenz- und Wildtypstämme lag die ermittelte MIC für die vier synthetischen AMP im Vergleich zu den Laborstämmen (*E. coli* DH5 α und *B. subtilis* DSM 347, Kap. 3.1, Tabelle 1) unter Verwendung von MHIIB und LB-Medium wesentlich höher.

Auch innerhalb der drei Stämme einer Spezies (*E. coli*) zeigten sich Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Substanzen (Tabelle 12 und 13).

Tabelle 12: Bestimmung der MIC [μM] für Gentamicin, WWW, WFW, IVWTI-M2a und MK5E unter Verwendung von MHIIB, die angegebenen Werte sind Maximalwerte

Bakterium	Gentamicin [μM]	WWW [μM]	WFW [μM]	IVWTI-M2a [μM]	MK5E [μM]
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,1	50	12,5	100	50
<i>St. aureus</i> ATCC 29213	1,1	50	25	>100	>100
<i>E. coli</i> DH5 α	0,5	25	6,3	50	50
<i>B. subtilis</i> DSM 347	0,5	6,3	6,3	12,5	12,5
<i>E. coli</i> , hämolysierend	2,1	50	12,5	50	50
<i>K. pneumoniae</i>	2,1	50	25	100	50
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,1	25	25	50	25
<i>Proteus vulgaris</i>	2,1	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus myxofaciens</i>	4,3	>100	>100	>100	>100

Tabelle 13: Bestimmung der MIC [μM] für Gentamicin, WWW, WFW, IVWTI-M2a und MK5E unter Verwendung von LB-Medium, die angegebenen Werte sind Maximalwerte

Bakterium	Gentamicin [μM]	WWW [μM]	WFW [μM]	IVWTI-M2a [μM]	MK5E [μM]
<i>E. coli</i> ATCC 25922	17	>100	12,5	12,5	6,3
<i>St. aureus</i> ATCC 29213	17	>100	50	>100	>100
<i>E. coli</i> , hämolysierend	32	12,5	6,3	12,5	12,5
<i>K. pneumoniae</i>	32	25	25	25	12,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	15,7	12,5	25	12,5	3,1
<i>Proteus vulgaris</i>	63,1	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus myxofaciens</i>	63,1	>100	>100	>100	>100

4.2 Effekt einer AMP-Supplementierung auf die Spermienmotilität in Abhängigkeit von der Konzentration (Versuch B)

Auf Grundlage der Ergebnisse der ersten Untersuchungen im Versuch A (Kap. 4.1) und im Hinblick auf die Bindungsstudien carboxyfluoreszeinmarkierter Peptide an Eberspermien (Kap. 4.4) und den Untersuchungen zur Wechselwirkung der Peptide mit der Spermienmembran (Kap. 4.5) wurden in einem „split-sample“-Verfahren an 12 Ejakulaten konzentrationsabhängige Motilitätseffekte der Peptide WFW, WWW, MK5E (Kap. 3.1, Tabelle 1) und der fluoreszenzmarkierten Peptide WWW[F] und [F]-M2a (Kap. 3.8, Tabelle 11) mittels CASA überprüft (Kap. 3.2, Abbildung 4).

Die fluoreszenzmarkierten, antimikrobiellen Peptide WWW[F] und [F]-M2a wurden eingesetzt, um einen Zusammenhang zwischen den Bindungsstudien der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und den Motilitätsparametern darzustellen. Es sei hier angemerkt, dass die an die Peptide gekoppelte Carboxyfluoresceingruppe grundlegende Struktureigenschaften veränderte, darunter die Ladung und Amphipathie der Moleküle, die wesentlich für die antimikrobielle Wirksamkeit der Peptide verantwortlich waren. Interessant war daher weiterhin die Fragestellung, ob die Wirkung fluoreszenzmarkierter Peptide auf die

Motilitätsparameter PROG P, PROG VAP, PROG ALH, PROG BCF, PROG DAP, LIN P, HYPER P und IMMOT P erhalten bleibt.

Nach 24 Stunden Lagerung wurden die konservierten Ejakulate ($n = 12$) bei 38 °C für fünf Minuten mit steigenden Konzentrationen (5 - 40 μM) von WFW, WWW, WWW[F], MK5E und [F]-M2a inkubiert. Es wurde überprüft, ob sich die einzelnen Peptidvarianten (Kap. 3.2, Abbildung 4) von der Kontrollvariante (K: BTS + 544 μM Gentamicin) signifikant ($p \leq 0,05$) unterschieden (Abbildung 30).

Die **WFW**-Varianten A2 ($p < 0,001$) und A3 ($p = 0,013$) hatten einen signifikanten Einfluss auf den Anteil aktiv vorwärts beweglicher (PROG P) bzw. unbeweglicher Spermien (IMMOT P). Die optimale Konzentration lag im Bereich von 10 μM . Unterhalb dieser Konzentration waren der Streckenparameter PROG DAP ($p = 0,006$) und der Geschwindigkeitsparameter PROG VAP ($p = 0,007$) signifikant verringert. Eine Konzentration von über 20 μM führte zu einer signifikant geringeren Kopfauslenkungsamplitude PROG ALH ($p = 0,003$) verbunden mit einer signifikant höheren Schlagfrequenz PROG BCF ($p < 0,001$). Die zuletzt genannten Parameter summierten sich zu einem signifikant höheren Anteil linear beweglicher Spermien LIN P ($p < 0,001$) oberhalb einer Konzentration von 10 μM (Abbildung 30A1-A4).

Die Effekte von **WWW** (Abbildung 30B1-B4) waren im Vergleich zum Kontrollverdünner (K: BTS + 544 μM Gentamicin) überwiegend nicht signifikant ($p > 0,05$), mit Ausnahme der erhöhten Schlagfrequenz PROG BCF ($p \leq 0,002$) bei allen Konzentrationen und der höheren Kopfauslenkungsamplitude PROG ALH ($p = 0,004$) bei einer Konzentration von 5 μM . Die Kopfauslenkungsamplitude verringerte sich tendenziell mit steigender Konzentration.

Die Untersuchung des Effektes des fluoreszenzmarkierten Peptids **WWW[F]** zeigte, dass hier ebenso wie bei WFW ein Konzentrationsoptimum vorhanden war (Abbildung 30C1-C4). Der Anteil vorwärts beweglicher Spermien (PROG P) erhöhte sich verglichen mit dem Kontrollmedium signifikant ($p = 0,023$) durch den Zusatz von 5 μM WWW[F]. Die Varianten C1 und C2 erhöhten signifikant die Strecken- und Geschwindigkeitsparameter PROG DAP ($p \leq 0,023$) und PROG VAP ($p \leq 0,005$). Eine weitere Steigerung der Konzentration verursachte tendenziell eine Verringerung des Anteils vorwärts beweglicher Spermien. Alle eingesetzten Konzentrationen von WWW[F] führten zu einem signifikanten Anstieg der seitlichen Kopfauslenkungsamplitude PROG ALH ($p \leq 0,036$).

Die Analyse der Effekte von **MK5E** ergab, dass zum Teil deutlich negative Konzentrationseffekte vorhanden waren, die sich im sukzessiven Anstieg des Anteils unbeweglicher Spermien (IMMOT P) bis zum dreifachen des Ausgangswertes bzw. im Abfall der progressiven Motilität (PROG P) mit steigender Konzentration manifestierten (Abbildung 30D1-D4). Konzentrationen über 10 μM führten zu statistisch gesicherten Unterschieden ($p < 0,001$). Geringere Konzentrationen erhöhten signifikant die Geschwindigkeit PROG VAP ($p = 0,002$) und Strecke PROG DAP ($p < 0,001$) der gemittelten Spermienbahn. Die fünfminütige Inkubation in Gegenwart von 5 μM ($p = 0,017$) oder 20 μM ($p = 0,017$) MK5E hatte eine signifikante Verstärkung der seitlichen Kopfauslenkungsamplitude PROG ALH zur Folge. Desweiteren stieg der Anteil hyperaktiver Spermien (HYPER P) in Konzentrationen unterhalb von 40 μM signifikant an ($p \leq 0,029$). Die Analysen der Motilitätsparameter im unteren und mittleren Konzentrationsbereich deuteten auf einen Effekt hin, der bei der Kapazitation von Spermien beobachtet werden kann.

Der Zusatz des fluoreszenzmarkierten Magainin-Derivats **[F]-M2a** (Abbildung 30E1-E4) führte insgesamt zu signifikant ($p \leq 0,05$) höheren Anteilen hyperaktiver Spermien (HYPER P). Parallel stieg die seitliche Kopfauslenkungsamplitude PROG ALH in allen eingesetzten Konzentrationen signifikant an ($p \leq 0,05$). Eine Zunahme der Geschwindigkeit im unteren Konzentrationsbereich bei gleichzeitig zum Teil höherer Kopfauslenkungsamplitude waren Hinweise für kapazitationsähnliche Veränderungen im Bewegungsmuster der Spermien.

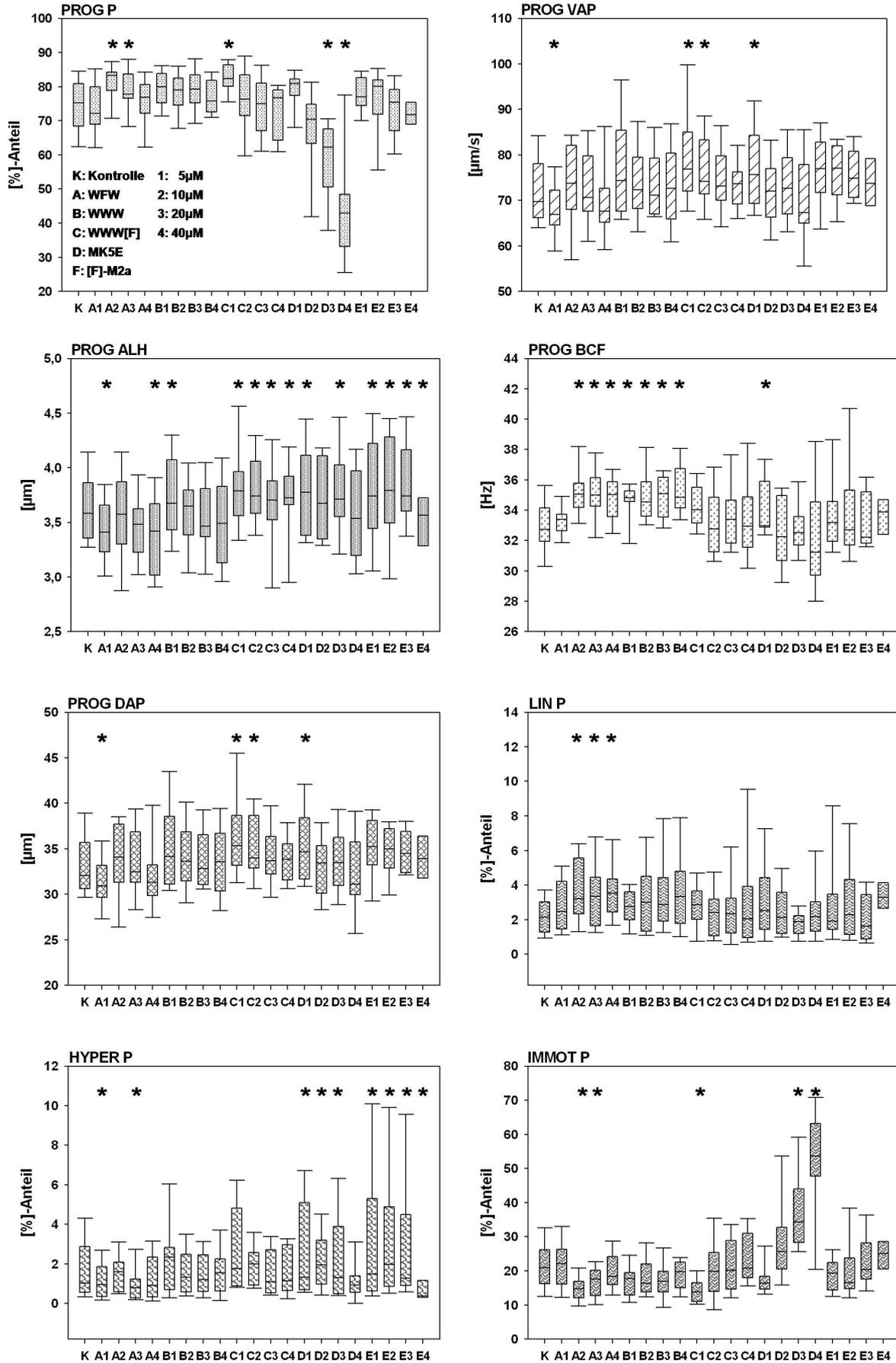


Abbildung 30: Legende siehe Seite 44.

Abbildung 30: Spermienmotilitätsanalyse (CASA) von 12 Ejakulaten, durchgeführt mit steigenden Konzentrationen (5, 10, 20 und 40 μM) der Peptide WFW, WWW, WWW[F], MK5E und [F]-M2a.

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

PROG P:	Anteile [%] progressiv motiler Spermien
PROG VAP:	durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeiten [$\mu\text{m s}^{-1}$] progressiv motiler Spermien
PROG ALH:	seitliche Kopfauslenkungsamplituden [μm] progressiv motiler Spermien
PROG BCF:	durchschnittliche Schlagfrequenzen [Hz] progressiv motiler Spermien
PROG DAP:	gemittelte Bahnen [μm] progressiv motiler Spermien
LIN P:	Anteile [%] geradlinig beweglicher Spermien
HYPER P:	Anteile [%] hyperaktiv beweglicher Spermien
IMMOT P:	Anteile [%] unbeweglicher Spermien
K: Kontrolle:	BTS + 544 μM Gentamicin
A₁₋₄: WFW:	5 μM, 10 μM, 20 μM und 40 μM
B₁₋₄: WWW:	5 μM, 10 μM, 20 μM und 40 μM
C₁₋₄: WWW[F]:	5 μM, 10 μM, 20 μM und 40 μM
D₁₋₄: MK5E:	5 μM, 10 μM, 20 μM und 40 μM
E₁₋₄: [F]-M2a:	5 μM, 10 μM, 20 μM und 40 μM

Aus der Spermienmotilitätsanalyse des Versuchs B lässt sich schlussfolgern, dass:

- die Konzentration des Peptids einen entscheidenden Einfluss auf die Bewegungsform der Eberspermien hatte,
- in der Regel ein Konzentrationsoptimum vorlag,
- allgemein eine Konzentrationssteigerung einen negativen Einfluss auf die Motilität hatte,
- die Kopplung der Fluoreszenzgruppe das Bewegungsmuster der Spermien zusätzlich beeinträchtigte und
- Magainin-Derivate in der Lage waren, kapazitationsähnliche Veränderungen im Bewegungsmuster zu erzeugen.

4.3 Effekt einer Supplementierung von AMP und Gentamicin im Verlauf der Lagerung (Versuch C)

Ziel dieses Abschnitts war die Prüfung synergistischer Effekte zwischen dem Antibiotikum Gentamicin und den synthetisch hergestellten Peptiden WFW (V_2), WWW (V_3) und MK5E (V_4). Die Peptide und deren Konzentrationen (4 μM V_2 , 2 μM V_3 und 1 μM V_4) wurden durch die vorangegangenen Untersuchungen festgelegt (Kap. 4.1 und 4.2).

Unabhängig von den Ergebnissen der MIC-Bestimmung des Gentamicins (Kap. 4.1.6) wurde die Dosis in den Varianten V_{1-4} auf 34 μM reduziert. Die Variante V_1 enthielt kein Peptid.

Als Kontrollverdünner diente BTS + 544 μM Gentamicin. Es wurde an 20 Ejakulaten untersucht, ob sich die einzelnen Varianten V_{1-4} (Kap. 3.2) spermatologisch nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung signifikant ($p \leq 0,05$) vom Kontrollverdünner unterschieden.

Weiterhin wurde die Bestimmung der MIC an ausgewählten Bakterienstämmen (Kap. 3.7, Tabelle 10) nach CLSI-Standardverfahren in Mueller-Hinton-II-Bouillon (MHII B) durchgeführt und die Ergebnisse mit Testreihen im Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verglichen [378]. Abschließend wurde das Keimspektrum untersucht.

Die Ergebnisse folgender Parameter werden in dieser Abfolge dargestellt:

- pH-Wert,
- Akrosom-, Membran- und Mitochondrienstatus,
- Spermienmotilität,
- qualitativer, quantitativer Keimgehalt und Resistenzprüfung an ausgewählten Keimen.

4.3.1 Auswirkungen der Kombination aus Peptid und reduzierter Gentamicinkonzentration auf den pH-Wert des Verdüners

Nach 12 Stunden (V_{1-4}) und teilweise nach 48 Stunden Lagerung (V_1 , V_3 und V_4) erhöhte sich der pH-Wert der Versuchsproben signifikant ($p \leq 0,05$) im Vergleich zum Kontrollmedium (K: BTS + 544 μM Gentamicin), ohne jedoch den für Spermien physiologischen Bereich zu verlassen. Erst nach 96 Stunden Lagerung waren die pH-Werte in allen untersuchten Proben in einem vergleichbaren Bereich (Abbildung 31).

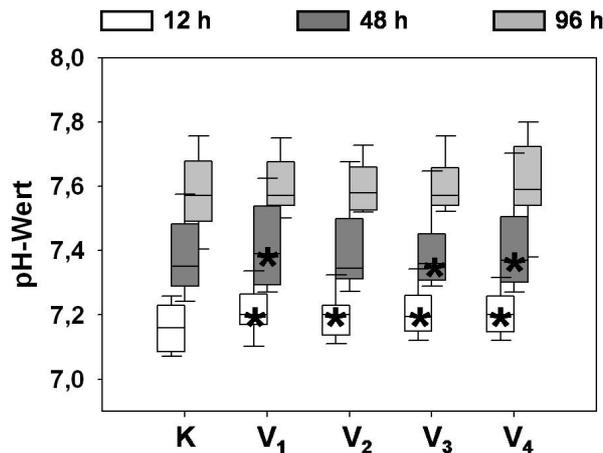


Abbildung 31: pH-Werte nach Zusatz der verschiedenen Varianten (K, V_{1-4}).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

4.3.2 Auswirkungen der Kombination aus Peptid und reduzierter Gentamicinkonzentration auf den Akrosom-, Membran- und Mitochondrienstatus

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse bestätigten die Daten der mikroskopischen Untersuchung. Der Anteil von Spermien mit „Normalem Apikalen Rand“ (NAR) und der Anteil gefärbter (akrosomgeschädigter) Spermien lag vom Gewinnungstag an bis zum Ende der Untersuchungen für die Varianten V_1 bis V_3 auf einem mit dem Kontrollverdünner (BTS + 544 μM Gentamicin) vergleichbaren Niveau (Abbildung 32).

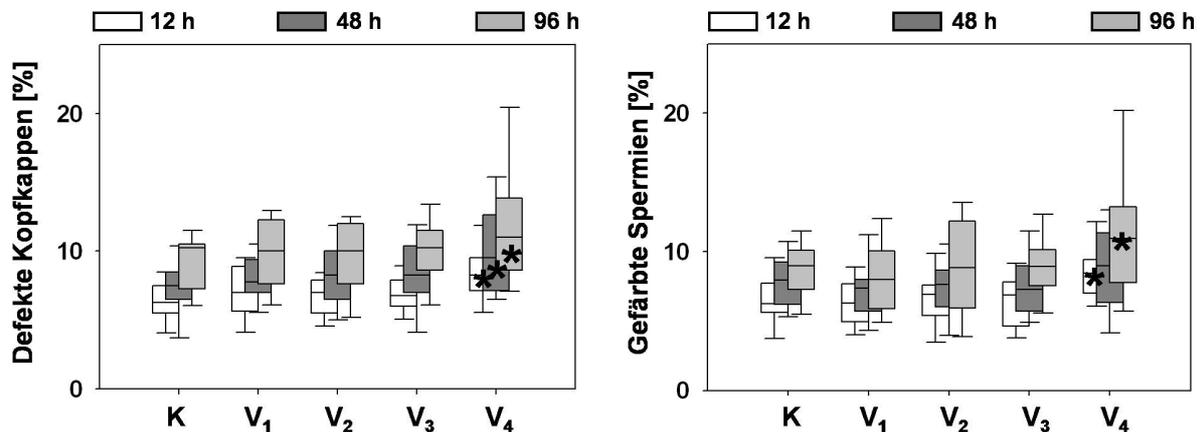


Abbildung 32: Anteile defekter Kopfkappen und Anteile FITC-PNA und/oder FITC-PSA gefärbter Spermien nach Zusatz der verschiedenen Varianten (V_{1-4}). Der Anteil gefärbter Spermien mit Akrosomdefekten errechnete sich im durchflusszytometrischen Verfahren aus der Summation der Quadranten zwei und vier (Kap. 3.6.2, Assay A).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Der Anteil gefärbter Spermien mit Akrosomendefekten errechnete sich im durchflusszytometrischen Verfahren aus der Summation der Quadranten zwei und vier (Kap. 3.6.2, Assay A). Die Differenzen zwischen dem Kontrollmedium und den Varianten V_{1-3} waren sehr gering und konnten zu keinem Zeitpunkt statistisch gesichert werden ($p > 0,05$). Signifikante Abweichungen von der Kontrollprobe ergaben sich für die Variante V_4 ($p < 0,001$). Der negative Effekt des Magainin-Derivats MK5E auf den Akrosom- und Membranstatus stieg mit zunehmender Lagerungsdauer an (Abbildung 32).

Die Versuchsvarianten $V_{2,4}$ hatten keinen statistisch ($p > 0,05$) gesicherten Einfluss auf den Anteil Rhodamin-gefärbter Spermien (Rh123-positiv) und auf die Intensität der Fluoreszenzfärbung nach 72 Stunden Lagerung (Abbildung 33). Lediglich in der Variante V_1 , die kein Peptid enthielt (BTS + 34 μ M Gentamicin), war tendenziell die Intensität der Färbung verringert.

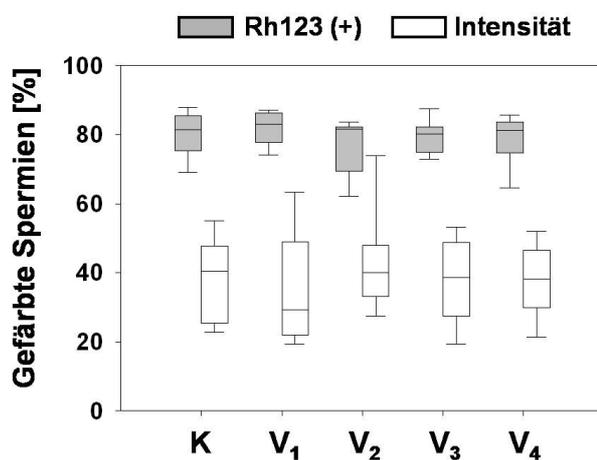


Abbildung 33: Anteile Rhodamin-gefärbter Spermien (Rh123-positiv) und Intensitäten der Fluoreszenzfärbungen in Gegenwart der verschiedenen Versuchsvarianten (K, V_{1-4}) nach 72 Stunden Lagerung. Der Anteil gefärbter Spermien wurde im durchflusszytometrischen Verfahren bestimmt (Kap. 3.6.2, Assay B).

4.3.3 Auswirkungen der Kombination aus Peptid und reduzierter Gentamicinkonzentration auf die Spermienmotilität

Das Motilitätsprofil der verschiedenen Versuchsvarianten (K, V_{1-4}) der motilen (MOT P) und progressiv motilen Spermienpopulationen (PROG P) unterschied sich während der Lagerungszeit und nach Inkubation im TRT kaum vom Kontrollverdünner (K: BTS + 544 μ M Gentamicin). Es gab jedoch zwei Ausnahmen: zum einen die WFW-Variante V_2 , zum anderen die MK5E-Variante V_4 (Abbildung 34).

Die Hexapeptidvariante V_2 zeichnete sich im Vergleich zum Kontrollmedium durch eine höhere Persistenz im TRT aus. Der Anteil motiler Spermien MOT P ($p = 0,02$) und progressiv motiler Spermien PROG P ($p = 0,004$) war nach 300-minütiger Inkubation nach 48 Stunden Lagerung signifikant erhöht. Hingegen verursachte die Kombination aus 34 μ M Gentamicin und 1 μ M MK5E eine Depression in der Spermienbewegung. Der Unterschied war signifikant im TRT nach 30 Minuten Inkubation (PROG P, $p = 0,019$) und nach 96 Stunden Lagerung ($p < 0,001$).

Die Kinetik der Spermienbewegung wird durch die durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeit PROG VAP und durch die gemittelte Bahn PROG DAP beschrieben. Für die Motilitätsparameter ergaben sich insbesondere nach 12 Stunden Lagerung signifikante Unterschiede (Abbildung 35). Sowohl in der Variante V_1 (BTS + 34 μ M Gentamicin) mit verringerter

Gentamicinkonzentration ohne Peptidzusatz als auch in den mit Peptid kombinierten Varianten V_2 bis V_4 verringerten sich die durchschnittlichen Gesamtgeschwindigkeiten PROG VAP signifikant ($p < 0,001$). In gleicher Weise verhielten sich die dazugehörigen Streckenparameter PROG DAP ($p < 0,001$).

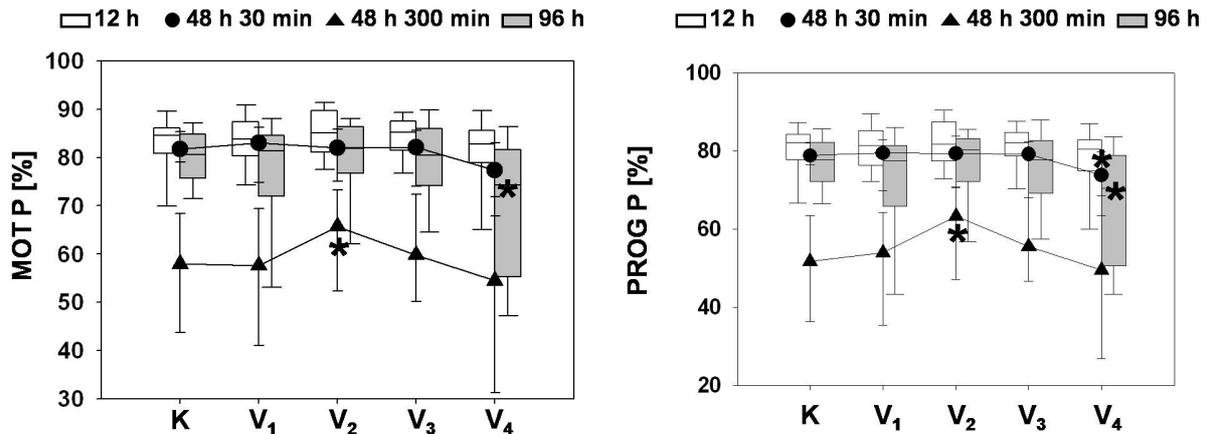


Abbildung 34: Anteile motiler Spermien (MOT P) und progressiv motiler Spermien (PROG P) in Gegenwart der verschiedenen Versuchsvarianten (K, V_{1-4}).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Auffällig war der Effekt des TRTs. Eine 300-minütige Inkubation führte zu einer deutlichen Erhöhung der durchschnittlichen Gesamtgeschwindigkeit PROG VAP und gemittelten Bahn PROG DAP in allen Proben im Vergleich zum Basiswert nach 30 Minuten Inkubation. Dabei unterschied sich der Basiswert des Streckenparameters PROG DAP der Varianten V_1 ($p = 0,007$), V_2 ($p = 0,013$) und V_3 ($p = 0,022$) signifikant vom Kontrollwert. Nach 96 Stunden Lagerung wiesen V_1 ($p = 0,019$) und V_4 ($p = 0,019$) im Geschwindigkeitsparameter PROG VAP und V_4 ($p = 0,019$) im Streckenparameter PROG DAP gegenüber dem Kontrollverdünner signifikant niedrigere Werte auf (Abbildung 35).

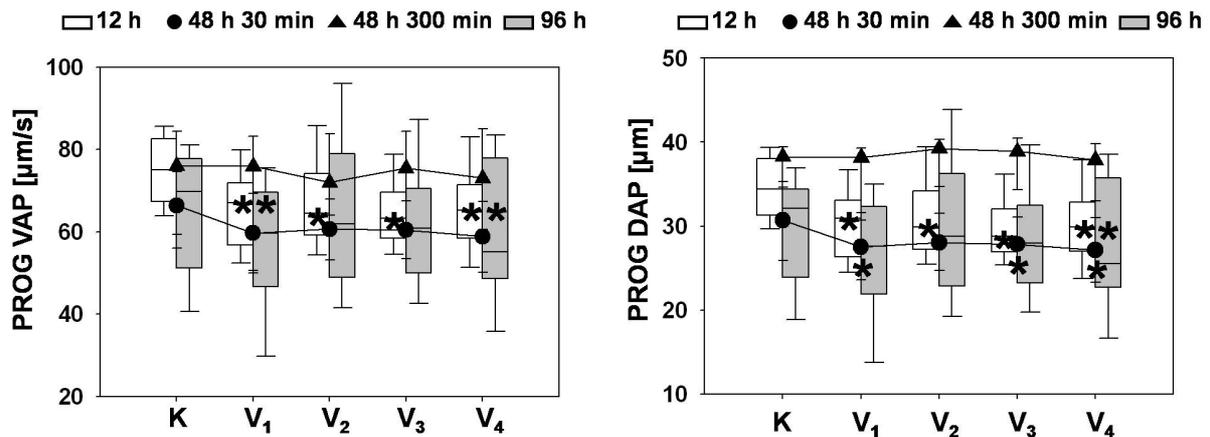


Abbildung 35: Durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeiten [$\mu\text{m s}^{-1}$] und gemittelte Bahnen [μm] progressiv motiler Spermien (PROG VAP, PROG DAP) in Gegenwart der verschiedenen Versuchsvarianten (K, V_{1-4}).

* kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Weiterhin verringerten sich die seitlichen Kopfauslenkungsamplituden PROG ALH ($p \leq 0,005$) und die Schlagfrequenzen PROG BCF ($p \leq 0,004$) der Varianten V_1 bis V_4 nach 12 Stunden Lagerung signifikant (Abbildung 36). Zu Testbeginn des TRTs wiesen alle Versuchsvarianten signifikant geringere Schlagfrequenzen auf ($p \leq 0,009$). Am Ende des TRTs stieg die Amplitude der Kopfauslenkung bei allen Versuchsvarianten (Abbildung 36).

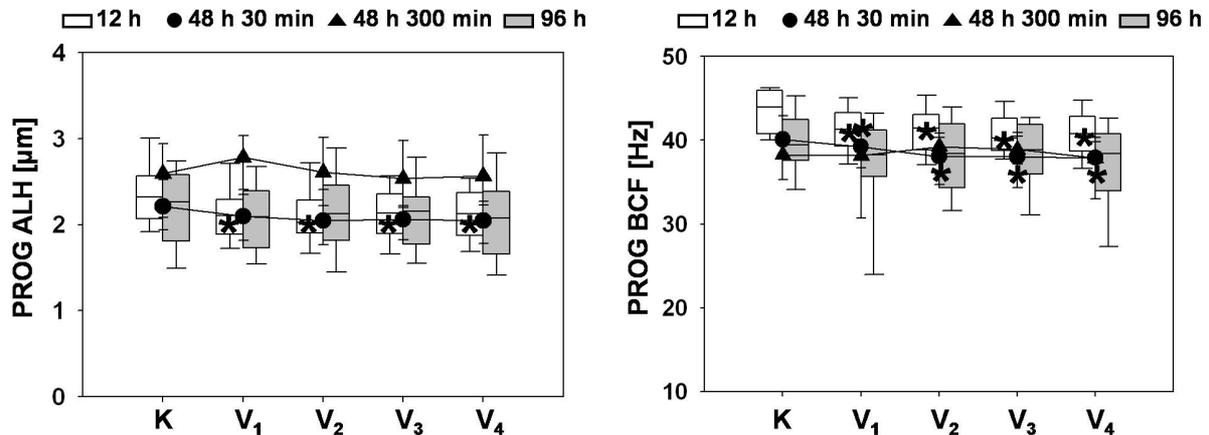


Abbildung 36: Kopfauslenkungsamplituden [μm] und Schlagfrequenzen [Hz] progressiv motiler Spermien (PROG ALH, PROG BCF) in Gegenwart der verschiedenen Versuchsvarianten (K, V₁₋₄). * kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Die Ergebnisse im Anteil linear progressiv motiler Spermien (LIN P) wiesen zwischen dem Kontrollmedium (K: BTS + 544 μM Gentamicin) und den Varianten V₁, V₂ und V₄ signifikante ($p \leq 0,05$) Differenzen auf (Abbildung 37). Statistisch gesichert war eine Abnahme im Anteil der geradlinig beweglichen Spermien (LIN P) nach 96 Stunden Lagerung für V₁ ($p = 0,006$) und V₄ ($p = 0,024$). Einen signifikant höheren Anteil der linear beweglichen Spermien erreichte lediglich die Variante V₂ im TRT, speziell nach 300-minütiger Inkubation ($p = 0,007$).

Die durchschnittlichen Gesamtgeschwindigkeiten der linear beweglichen Spermienpopulationen LIN VAP verringerten sich signifikant für die Versuchsvarianten V₁ ($p = 0,012$), V₃ ($p = 0,012$) und V₄ ($p < 0,001$) nach 12 Stunden Lagerung und tendenziell nach 96 Stunden Lagerung (Abbildung 37).

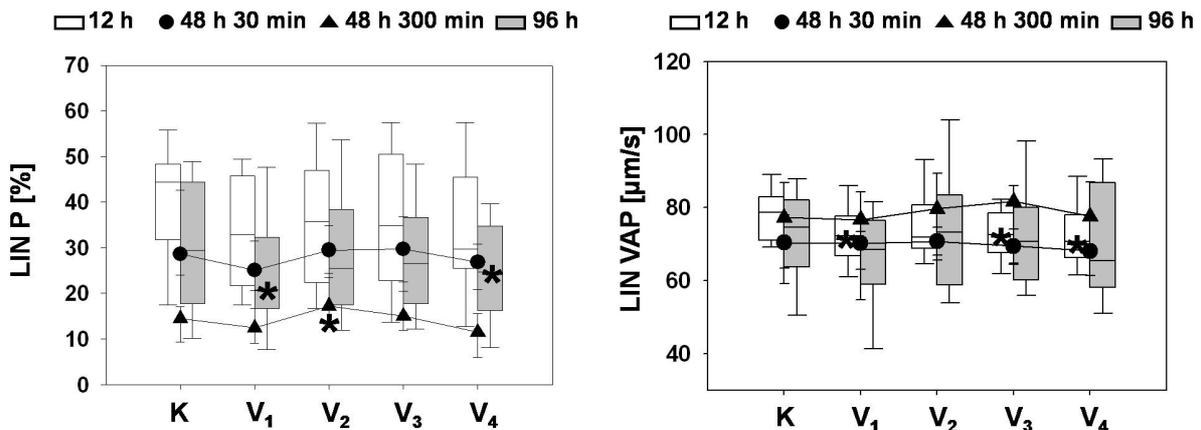


Abbildung 37: Anteile linear progressiv motiler Spermien und durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeiten [$\mu\text{m s}^{-1}$] linear progressiv motiler Spermien (LIN P, LIN VAP) in Gegenwart der verschiedenen Versuchsvarianten (K, V₁₋₄). * kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Im Anteil hyperaktiv beweglicher Spermien HYPER P konnten zwischen dem Kontrollverdünner BTS + 544 μM Gentamicin und den Versuchsvarianten keine statistisch gesicherten Unterschiede ($p > 0,05$) nachgewiesen werden (Abbildung 38).

Im direkten Vergleich der unbeweglichen Spermienpopulation IMMOT P zeigte sich wiederum eine erhöhte Stressresistenz der Variante V₂ im TRT nach 300 Minuten. Der Effekt war signifikant ($p = 0,02$). Ebenso signifikant, aber gegensätzlich war der Einfluss des Magainin-Derivats MK5E ($p = 0,002$), insbesondere nach 96 Stunden Lagerung (Abbildung 38).

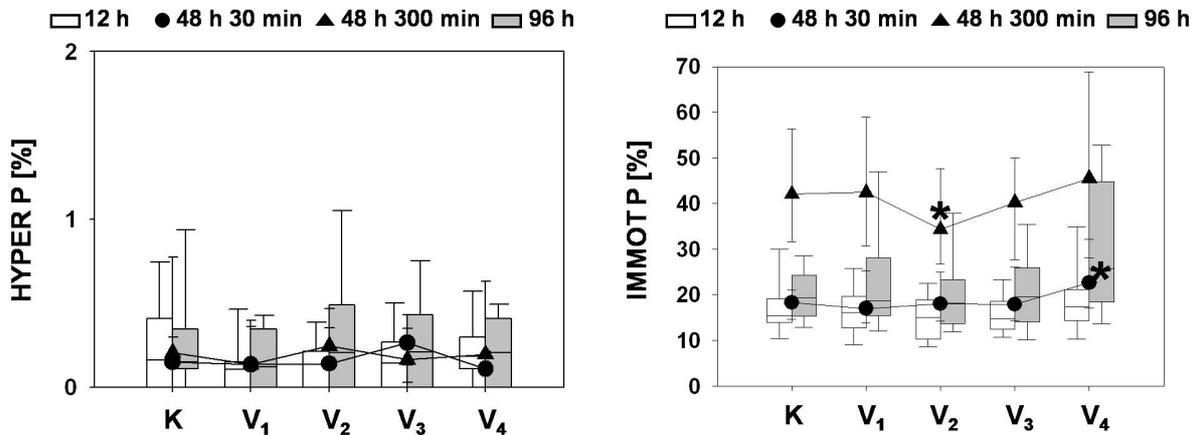


Abbildung 38: Anteile hyperaktiv progressiv motiler (HYPER P) und unbeweglicher (IMMOT P) Spermien in Gegenwart der verschiedenen Versuchsvarianten (K, V₁₋₄).
 * kennzeichnet signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zur Kontrolle (K: BTS + 544 μM Gentamicin)

Die Daten der Spermienmotilitätsanalyse des Versuchs C lassen sich wie folgt zusammenfassen.

- Die Reduktion der Gentamicinkonzentration auf 34 μM ohne Peptidzusatz hatte einen negativen Einfluss auf die Motilitätsparameter.
- Alle Varianten mit reduzierter Gentamicinkonzentration führten nach 12 Stunden Lagerung zur Verringerung der durchschnittlichen Gesamtgeschwindigkeit PROG VAP, der gemittelten Bahn PROG DAP, der seitlichen Kopfauslenkungsamplitude PROG ALH und der Schlagfrequenz PROG BCF progressiv motiler Spermien.
- Die Kombination aus 4 μM WFW und 34 μM Gentamicin hatte einen positiven Einfluss auf den Anteil aktiv vorwärts beweglicher Spermien (PROG P), linear beweglicher Spermien (LIN P) und unbeweglicher Spermien (IMMOT P) im TRT nach 300-minütiger Inkubation.
- Die Kombination aus 1 μM MK5E und 34 μM Gentamicin führte insgesamt zu einer negativen Beeinträchtigung der Spermienbewegung.

4.3.4 Untersuchungen des Keimpektrums nach Zusatz verschiedener Peptide und reduzierter Gentamicinkonzentration

Jedes Ejakulat wurde nach der Flüssigkonservierung in drei Aliquots aufgeteilt und diese nach drei definierten Lagerungszeiten (12, 48 und 96 Stunden Lagerung) auf ihren Keimgehalt untersucht (Tabelle 14). Die Ergebnisse wurden im Vergleich zum Kontrollverdünner (K: BTS + 544 μM Gentamicin) und zum Nativsperma beurteilt.

Tabelle 14: Maximale Lebendkeimzahlen [KbE ml^{-1}] im Sperma nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung

Konservierungsvariante (n = 20)	12 h	48 h	96 h
K: BTS + 544 μM Gentamicin	0 - $<10^3$	0 - $<10^3$	0 - $<10^3$
V ₁ : BTS + 34 μM Gentamicin	>10 - $<10^3$	>10 - $<10^8$	>10 - $<10^8$
V ₂ : BTS + 34 μM Gentamicin + 4 μM WFW	0 - $<10^3$	0 - $<10^3$	0 - $<10^4$
V ₃ : BTS + 34 μM Gentamicin + 2 μM WWW	0 - $<10^3$	0 - $<10^3$	0 - $<10^5$
V ₄ : BTS + 34 μM Gentamicin + 1 μM MK5E	0 - $<10^3$	0 - $<10^4$	0 - $<10^7$

Die Lebendkeimzahl (KbE ml⁻¹) im Nativsperma stieg nach 96 Stunden Lagerung auf über 10⁸ KbE ml⁻¹. Bei Anwendung des Standardverfahrens (K: BTS + 544 µM Gentamicin) waren 23% der Proben ohne nachweisbaren Keimgehalt. Bei Verwendung von 34 µM Gentamicin und WFW (V₂) waren nach 96 Stunden 10% ohne nachweisbaren Keimgehalt. Gentamicin und WWW (V₃) ergaben 15% und Gentamicin und MK5E (V₄) eine Kultur-negative Probe nach 96 Stunden Lagerung. Die maximale Menge an Keimen des Standardverfahrens (K: BTS + 544 µM Gentamicin) ergab nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung weniger als 10³ KbE ml⁻¹ (Tabelle 14). Bei Verwendung von 34 µM Gentamicin und den Peptiden WFW 4 µM (V₂), WWW 2 µM (V₃) und MK5E 1 µM (V₄) waren nach 12 Stunden Lagerung ebenfalls weniger als 10³ KbE ml⁻¹ nachweisbar. Nach 48 Stunden Lagerungszeit ergaben nur noch die Versuchsvarianten V₂ und V₃ weniger als 10³ KbE ml⁻¹. Die Variante V₄ erreichte weniger als 10⁴ KbE ml⁻¹. Nach 96 Stunden Lagerung ergab die Lebendkeimzahl für die Variante V₂ weniger als 10⁴ KbE ml⁻¹, für die Variante V₃ weniger als 10⁵ KbE ml⁻¹ und für die Variante V₄ weniger als 10⁷ KbE ml⁻¹ (Tabelle 14).

Mit Ausnahme der MK5E-Variante V₄ und der Variante mit reduzierter Gentamicinkonzentration ohne Peptid (V₁) waren die Werte vergleichbar mit den Ergebnissen des Standardverdünners BTS + 544 µM Gentamicin. Verglichen mit dem Standardverfahren führte die alleinige Reduktion der Gentamicinkonzentration von 544 µM auf 34 µM in der Variante V₁ ohne Peptidzusatz bereits nach 48 Stunden Lagerung zu einem deutlichen Anstieg der Keimzahl von 10³ auf 10⁸ KbE ml⁻¹. Bei Anwendung von 34 µM Gentamicin und 4 µM WFW bzw. 2 µM WWW reduzierten sich die Lebendkeimzahlen im Vergleich zur Anwendung von 34 µM Gentamicin ohne Peptid nach 48 Stunden Lagerung um den Faktor 10⁵ bzw. nach 96 Stunden Lagerung um den Faktor 10³ bis 10⁴ (Tabelle 14). Besonders die Kombinationsvariante V₂ aus 4 µM WFW und 34 µM Gentamicin zeigte nach 96-stündiger Lagerung stabile Gesamtkeimzahlen.

Abbildung 39 gibt einen Überblick über das Keimspektrum. Sieben verschiedene gram-negative Keime wurden aus den verdünnten Spermaproben isoliert. Fünf davon gehörten zur Familie der Enterobacteriaceae. Alle Varianten der Flüssigkonservierung enthielten bis zu drei verschiedene *Proteus*-Arten. *Stenotrophomonas maltophilia* war in einem Drittel aller Proben nachweisbar.

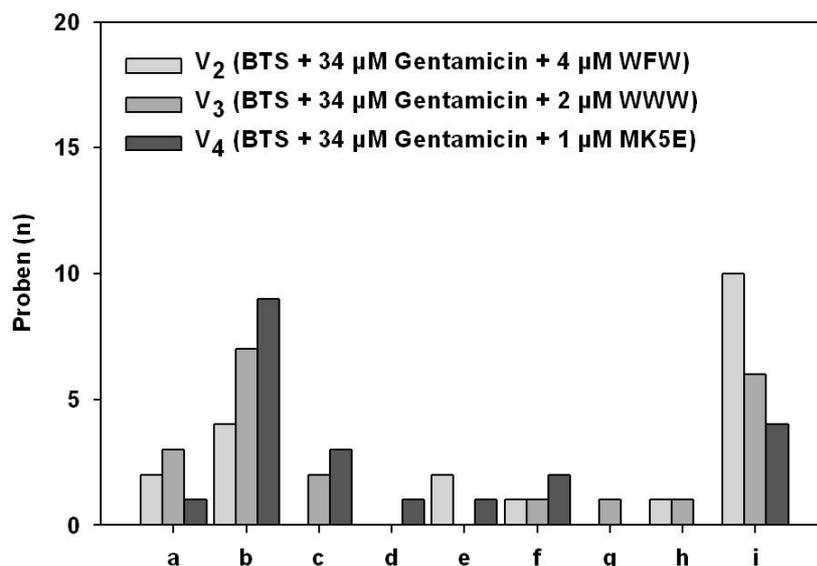


Abbildung 39: Keimspektrum bei Verwendung der verschiedenen Synergievarianten.
a: kein Keimgehalt; b: unspezifische Mischflora; c: *Proteus mirabilis*; d: *Proteus vulgaris*;
e: *Proteus* sp.; f: *Serratia liquefaciens*; g: *Providencia alkalifaciens*; h: *Ralstonia pickettii*;
i: *Stenotrophomonas maltophilia*

4.3.5 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) an ausgewählten Bakterienstämmen nach Zusatz verschiedener Peptide und reduzierter Gentamicinkonzentration

Die Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) wurde nach dem CLSI-Standardverfahren in Mueller-Hinton-II-Bouillon (MHIIIB) durchgeführt und die Ergebnisse mit Testreihen im Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verglichen [378]. Bei jedem Versuch wurde die Bestimmung der MIC für Gentamicin „alleine“ als Kontrollwert mitgeführt. Es wurde eine Gentamicin-Verdünnungsreihe (2,2 µM bis 0,05 µM) für die MHIIIB-Versuche hergestellt und mit der gewünschten Peptidkonzentration versetzt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Bestimmung der MIC [µM] für Gentamicin (Standardwert) und Gentamicin bei gleichzeitiger Anwendung von WWW oder MK5E im MHIIIB, die angegebenen Werte sind Maximalwerte

Bakterium	MIC Gentamicin [µM]	MIC Gentamicin WWW 2 µM	MIC Gentamicin MK5E 1 µM
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,7	1,5	1,7
<i>St. aureus</i> ATCC 29213	1,5	1,5	1,3
<i>E. coli</i> , hämolysierend	2,2	1,9	1,9
<i>K. pneumoniae</i>	2,2	1,5	1,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,2	0,9	0,9
<i>Proteus vulgaris</i>	2,2	1,7	1,7
<i>Proteus myxofaciens</i>	4,3	1,9	1,9

Für die Untersuchungen im LB-Medium wurden für die Tests mit den Referenzstämmen (Kap. 3.7, Tabelle 10) eine Verdünnungsreihe von 22 µM bis 1 µM gewählt, da die MIC von Gentamicin gegenüber beiden Referenzstämmen bei 17 µM lag (Kap. 4.1.6, Tabelle 13). Für die Wildtypstämmen wurde eine Verdünnungsreihe von 500 µM bis 0,25 µM gewählt. Im CLSI-Standardverfahren waren alle Keime, sofern MIC-Referenzbereiche zur Verfügung standen, gegenüber Gentamicin empfindlich. Vergleicht man die Ergebnisse in den zwei unterschiedlichen Nährmedien LB und MHIIIB miteinander, wird auch hier wiederholt deutlich, dass sich die MIC-Werte zwischen beiden Medien stark unterscheiden. Diese Daten bestätigen vorangegangene Untersuchungsreihen (Kap. 4.1.6). Das Standardantibiotikum Gentamicin erreichte die MIC im LB-Medium im Vergleich zum MHIIIB-Medium erst bei einer vielfach höheren Konzentration. Unterschiede zwischen Gentamicin und Gentamicin + Peptid (WWW, MK5E) wurden nicht festgestellt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Bestimmung der MIC [µM] für Gentamicin (Standardwert) und Gentamicin bei gleichzeitiger Anwendung von WWW oder MK5E im LB-Medium, die angegebenen Werte sind Maximalwerte

Bakterium	MIC Gentamicin [µM]	MIC Gentamicin WWW 2 µM	MIC Gentamicin MK5E 1 µM
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,1	12,1	12,1
<i>St. aureus</i> ATCC 29213	7,8	6,9	6,0
<i>E. coli</i> , hämolysierend	31,3	31,3	31,3
<i>K. pneumoniae</i>	31,3	31,3	31,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	15,6	15,6	15,6
<i>Proteus vulgaris</i>	62,6	62,6	62,6
<i>Proteus myxofaciens</i>	62,6	62,6	62,6

Die Anwendung von Gentamicin (MIC-Bereich) und 2 μM WWW sowie 1 μM MK5E im MHIIB-Medium führte zu einer Verringerung der MIC gegenüber *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* und *Proteus myxofaciens* (Tabelle 15). Bezogen auf die anderen Bakterien verschob sich die MIC nur geringfügig. Insgesamt gesehen lagen die MIC-Werte für Gentamicin und Gentamicin + Peptid (WWW, MK5E) im äquimolaren Bereich.

4.4 Bindungsstudien carboxyfluoreszeinmarkierter Peptide an Eberspermien

Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) wurden im Rahmen dieser Arbeit Bindungsstudien carboxyfluoreszeinmarkierter, antimikrobieller Peptide an Eberspermien durchgeführt. Die Untersuchungen ermöglichten Aussagen über eine räumliche Lokalisation fluoreszenzmarkierter Konjugate an Eberspermien. Eine Fixierung der Zellen mit chemischen Agentien kann zu einer Artefaktbildung mit daraus resultierender Fehlinterpretation der Lokalisation führen. Für die Bindungsstudien wurden die fluoreszeinmarkierten Peptide WW[F], WWW[F] und [F]-M2a genutzt (Kap. 3.8, Tabelle 11). Durch Kopplung der Fluoreszenzgruppe unterschieden sich die Peptide hinsichtlich Ladung und Amphipathie von den zyklischen und helikalen Ausgangspeptiden (Kap. 3.1, Tabelle 1). In Abbildung 40A und 40B sind Eberspermien dargestellt, die mit Propidiumjodid und WWW[F] inkubiert wurden.

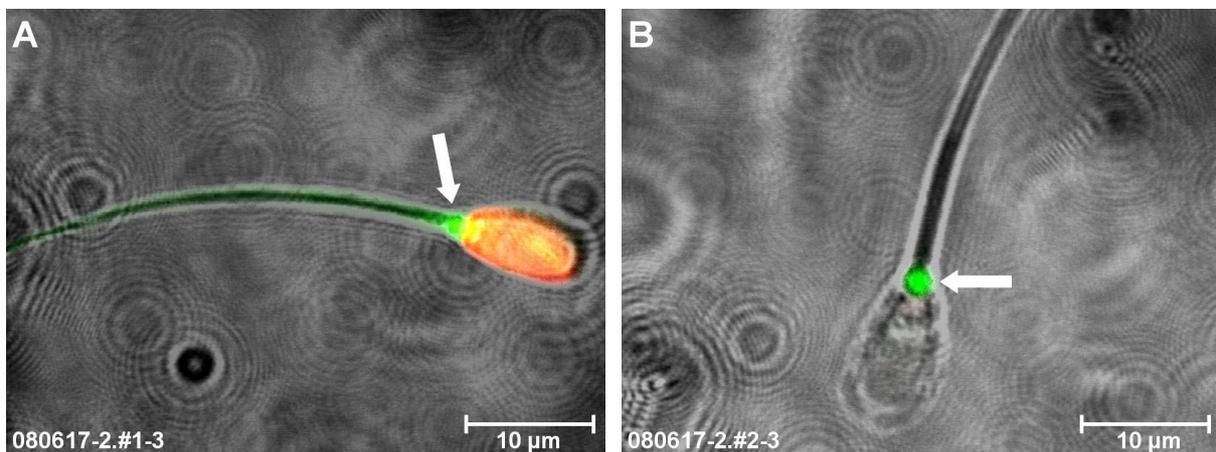


Abbildung 40: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von Eberspermien mit charakteristischem Bindungsmuster nach Inkubation mit Propidiumjodid und carboxyfluoreszeinmarkiertem Hexapeptid (WWW[F], Überlagerungsbilder aus DIC, grünem und rotem Fluoreszenzkanal).

A) koinkubiert mit Propidiumjodid (rot) und WWW[F] (grün). Das membrandefekte Spermium zeigt sowohl Rotfluoreszenz im Kopfbereich (PI-positiv) als auch homogene Grünfluoreszenz im Schwanzbereich. Die Gelbfärbung im Kopfbereich resultiert aus der Überlagerung von Grün- und Rotfluoreszenz. Der Pfeil markiert ein stärkeres Grünfluoreszenzsignal am Übergang zwischen Kopf und Schwanz.

B) koinkubiert mit Propidiumjodid und WWW[F] (grün). Besonders auffällig ist die sehr starke Grünfluoreszenz im Bereich der Insertionsgrube bzw. Basalplatte (Pfeil), hier bei einem PI-negativen, plasmamembranintakten Eberspermium.

Abbildung 40A zeigt ein Eberspermium, das nach Anregung eine Rotfluoreszenz im Kopfbereich (PI-positiv) und eine typische Grünfluoreszenz (WWW[F]) im Kopf- und Mittelstückbereich aufweist. Die Grünfluoreszenz ist diffus verteilt. Die Gelbfärbung im Kopfbereich resultiert aus der Überlagerung von Grün- und Rotfluoreszenz. Der Pfeil markiert eine verstärkte Akkumulation des Peptids am Übergang zwischen Kopf und Mittelstück. Abbildung 40B zeigt ein PI-negatives, vitales Eberspermium, das nach Anregung eine verstärkte Grünfluoreszenz (WWW[F]) im Bereich der Insertionsgrube (Pfeil) aufweist.

Die Eberspermien, die in Abbildung 41A und 41B dargestellt sind, wurden mit Propidiumjodid und [F]-M2a inkubiert. Beide Spermien in Abbildung 41A fluoreszieren nach Anregung grün ([F]-M2a) im Bereich der defekten Akrosomen (Pfeile). Die geschädigten Akrosomenkappen (grün) heben sich dabei feinwolkig strukturiert vom PI-positiven *Nukleus* (rot) ab. Das PI-positive Eberspermium (rot) in der Abbildung 41B ist primär im Bereich des Mittelstücks (Mitochondrienscheide) durch [F]-M2a fluoreszenzmarkiert (Pfeil).

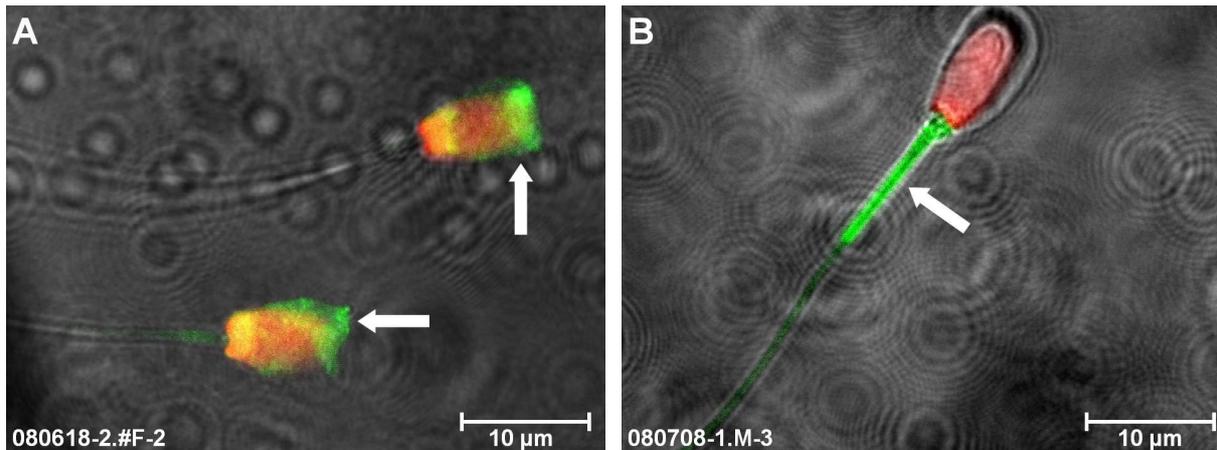


Abbildung 41: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von Eberspermien mit charakteristischem Bindungsmuster nach Inkubation mit Propidiumjodid und carboxyfluoreszeinmarkiertem Magainin-Derivat ([F]-M2a, Überlagerungsbilder aus DIC, grünem und rotem Fluoreszenzkanal) A) koinkubiert mit Propidiumjodid (rot) und [F]-M2a (grün). Die membrandefekten Spermien zeigten ein starkes Grünfluoreszenzsignal im Bereich der geschwollenen Akrosomenkappen (Pfeile). Beide Spermien waren zusätzlich PI-positiv (rot). B) koinkubiert mit Propidiumjodid (rot) und [F]-M2a (grün). Das PI-positive Spermium (rot) ist vor allem im Bereich des Mittelstücks (Mitochondrienscheide) durch das Magainin-Derivat fluoreszenzmarkiert (Pfeil).

Aus den Beobachtungen lässt sich folgern, dass grundsätzlich eine Peptid-Spermien-Interaktion bestand. Einen wesentlichen Einfluss hatten dabei die Strukturcharakteristika der Peptide. Die Experimente zeigten weiterhin, dass beide Peptidgruppen unterschiedliche, aber typische Bindungsmuster besaßen.

Die fluoreszenzmarkierten Hexapeptide wiesen eine Grünfluoreszenz im Kopf- und Schwanzbereich der Spermien mit verstärktem Fluoreszenzsignal an der Insertionsgrube auf. Dagegen zeigten die Magainin-Derivate eine hohe Affinität zu den Akrosomen und zum Mittelstück (Mitochondrienscheide) der Eberspermien. Die Peptidstruktur beeinflusst demnach die Lokalisation der Konjugate an verschiedenen Zellkompartimenten und kann folglich für eine unterschiedliche biologische Aktivität der Peptide verantwortlich gemacht werden.

4.5 Charakterisierung der Wechselwirkung von Peptiden mit der Spermienzellmembran

Um eine mögliche Wechselwirkung der Peptide mit der Spermienzellmembran zu charakterisieren, wurden spinmarkierte Phospholipidanaloga in die Zellmembran von Eberspermien eingebaut [242].

Unmittelbar nach dem Einbau der Spinlabel SL-PC, SL-SM und SL-PS (Kap. 3.9.1) bei Raumtemperatur wurden die Proben in die Messküvette überführt und auf die jeweilige Messtemperatur gebracht. Die Spektren wurden bei 16 °C, 22 °C und 38 °C aufgenommen. Die Form der ESR-Spektren spiegelt die Rotationsbeweglichkeit der Spinsonden wider. Nach

Zusatz der Peptide konnten anhand der Spektrenform unterschiedliche Beweglichkeiten der Spinlabel abgeleitet werden (Abbildung 42 und 43).

Die aus den ESR-Spektren berechneten Korrelationszeiten werden als quantitatives Maß der Rotationsbeweglichkeit der Label in Abwesenheit (BTS) und in Gegenwart der verschiedenen Peptidzusätze dargestellt (Tabelle 17). Eine verringerte Korrelationszeit (τ_c) entspricht dabei einer erhöhten Mikrofluidität in der Umgebung des spinmarkierten Lipids. Mit steigender Temperatur wurde für alle Label eine erhöhte Fluidität ermittelt (Tabelle 17). Der Vergleich der Beweglichkeit verschiedener Phospholipide ergab, dass SL-PS eine geringere Korrelationszeit als SL-SM besaß. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass SM hauptsächlich in der äußeren und PS vorrangig in der inneren Hälfte der Zellmembran lebender Spermien lokalisiert ist.

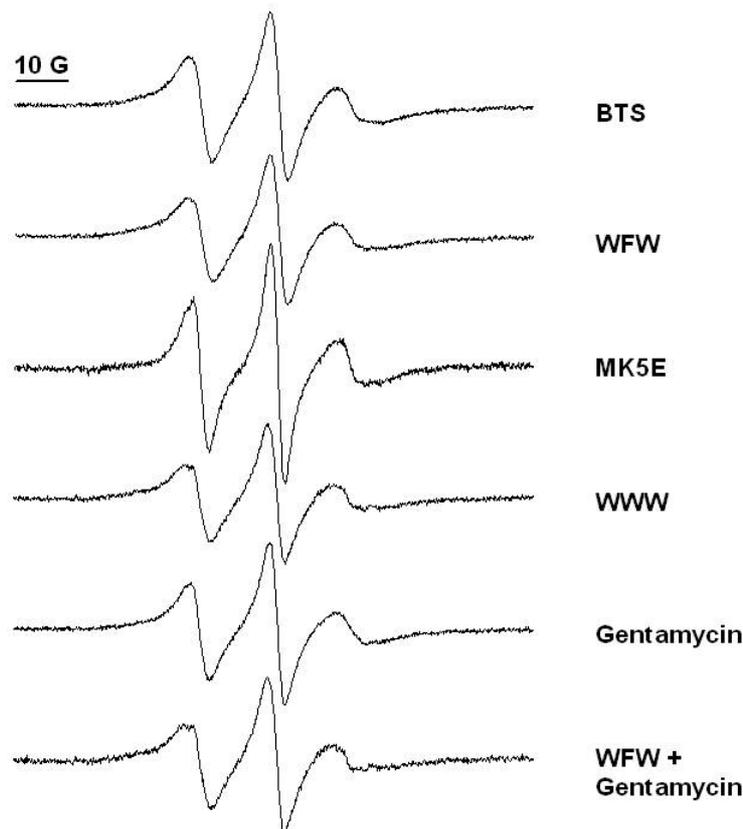


Abbildung 42: ESR-Spektren von SL-PC in der Zellmembran von Eberspermien nach Zusatz der verschiedenen AMP (BTS-Verdüner, WFW, MK5E, WWW, Gentamicin und WFW + Gentamicin). Die ESR-Spektren wurden auf die Intensität des Mittelfeldsignals normiert und bezüglich der Hydrolyse der Label korrigiert. Der Einbau der spinmarkierten Lipidanaloga erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Spermien in der Messküvette auf die Versuchstemperatur eingestellt (hier: 16 °C) und die ESR-Spektren aufgezeichnet (Leistung: 10 mW; Modulation: 2 G; Scanbreite: 100 G; Akkumulation: 2-4fach).

Generell wird davon ausgegangen, dass die Fluidität in der dem Zytoplasma zugewandten Hälfte der Membran höher ist als auf der exoplasmatischen Seite [118, 246, 257]. PC ist zwischen beiden Membranhälften annähernd gleich verteilt. SL-PC zeigt dementsprechend mittlere Korrelationszeiten (Tabelle 17).

Die ESR-Spektren von SL-PC in Spermien mit bzw. ohne Peptidzusatz unterschieden sich, wie aus Abbildung 43 durch Überlagerung der Spektren ersichtlich wird. Anhand der Form der ESR-Spektren war das Auftreten freier spinmarkierter Fettsäuren erkennbar. Zersetzt die Hydrolyse durch Phospholipasen mehr als 20% der Label, sollte die Auswertung der Daten als kritisch angesehen werden. Für eine Korrektur wurden daher die Spektren der freien

Fettsäuren nach kompletter Hydrolyse der Label aufgenommen und der den markierten freien Fettsäuren zuzuordnende Anteil von den Gesamtspektren subtrahiert [285].

Tabelle 17: Korrelationszeiten (τ_c) für die Rotation der Spinlabel SL-SM, SL-PC und SL-PS in der Zellmembran von Eberspermien bei 16 °C, 22 °C und 38 °C. Die Korrelationszeiten [ns] wurden aus den ESR-Spektren berechnet.

	Temperatur	BTS	Gentamycin	WFW	WWW	MK5E
SL-SM	16 °C	3,94	3,62	4,39	4,42	3,06
	22 °C	3,04	n.b.	4,17	3,91	2,83
SL-PC	16 °C	2,58	2,56	3,12	3,3	2,41
	22 °C	2,61	2,18	3,17	3,06	1,93
	38 °C	0,95	n.b.	1,12	n.b.	0,86
SL-PS	16 °C	2,32	2,26	2,45	2,44	2,53
	22 °C	1,85	n.b.	n.b.	1,87	1,87

n.b. = nicht bestimmt

Die Hexapeptidvarianten WFW und WWW bewirkten eine Verbreiterung der ESR-Spektren bzw. eine Erhöhung der Korrelationszeit, die eine Immobilisierung des SL-PC in der Spermienzellmembran anzeigten (Tabelle 17). In Anwesenheit von MK5E verringerte sich hingegen die Korrelationszeit. Die Spermienzellmembran wurde durch den Zusatz des Magainin-Derivats fluider, was auch nach Zusatz von IVWTI-M2a gefunden wurde (nicht dargestellt).

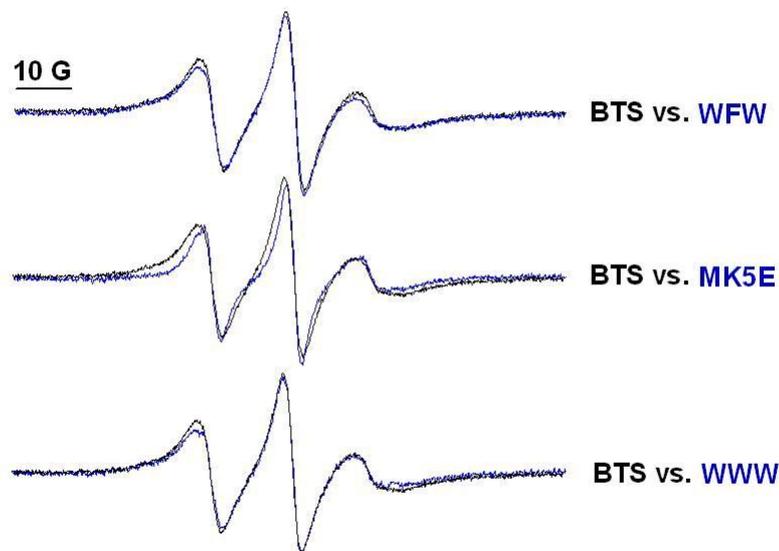


Abbildung 43: Vergleichende Darstellung der ESR-Spektren SL-PC markierter Eberspermien in BTS mit/ohne Peptidzusatz (WFW, MK5E und WWW). Die Spektren wurden auf die Intensität des Mittelfeldsignals normiert und bezüglich der Hydrolyse der Label korrigiert. Der Einbau der spinmarkierten Lipidanaloga erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Spermien in der Messküvette auf die Versuchstemperatur eingestellt (hier: 16 °C) und die ESR-Spektren aufgezeichnet (Leistung: 10 mW; Modulation: 2 G; Scanbreite: 100 G; Akkumulation: 2-4fach).

Gentamicin hatte, wenn überhaupt, einen leicht fluidisierenden Effekt auf die Spermienzellmembran. Die Auswirkungen der Peptidzusätze auf die Rotationsbeweglichkeit der spinmarkierten Phospholipidanaloga sind bei SL-SM und SL-PC gegenüber SL-PS stärker ausgeprägt (Tabelle 17). Der fluidisierende Effekt von MK5E blieb gegenüber SL-PS gänzlich aus.

Demnach sprechen die ESR-Untersuchungen für eine Wechselwirkung der Peptide vornehmlich mit Lipiden auf der exoplasmatischen Spermienmembranhälfte. Eine Kopfgruppenspezifität der Peptid-Lipid-Wechselwirkungen konnte ausgeschlossen werden, da die Peptide mit allen Labeln im BTS-Verdünner ohne Spermien in Wechselwirkung traten (nicht dargestellt).

Um eine Aussage zur Bindungsaffinität bzw. zur Reversibilität der Wechselwirkung von Peptiden und Spermienzellmembran zu treffen, wurden SL-PC- und SL-SM-markierte Spermien nach der Messung mit den Peptiden in BTS gewaschen, in BTS ohne Peptide resuspendiert und erneut vermessen. Im Fall der zyklischen Hexapeptide war der immobilisierende Effekt fast vollständig aufgehoben. Daraus lässt sich folgern, dass die Rigidifizierung der Zellmembran an die Gegenwart dieser Peptide geknüpft und deren Bindungsaffinität an die Membran gering ist. Der fluidisierende Effekt des MK5E blieb dagegen weitgehend erhalten.

5 Diskussion

Antibakterielle Zusätze schaffen eine erhöhte Sicherheit bei einer unbeabsichtigten bakteriellen Verunreinigung des Spermas während der Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung [74]. Vor dem Hintergrund steigender Resistenzen gegenüber herkömmlichen antibakteriellen Konservierungsstoffen spielt die Erforschung alternativer Stoffsubstanzen eine zunehmend wichtige Rolle [8]. Die deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie (DART) fordert eine Risikominimierung in der Tierhaltung, indem zum einen Antibiotika kontrolliert angewandt werden, zum anderen Alternativen zur Antibiotika-Anwendung verstärkt entwickelt werden, um langfristig die Mengen der eingesetzten Antibiotika abzusenken.

Gegenstand dieser Arbeit waren Versuche, in denen antimikrobielle Peptide „allein“ (Kap. 4.1 und 4.2) und in Kombination mit Gentamicin (Kap. 4.3) zur Flüssigkonservierung von Eberspermien bei 16 °C eingesetzt wurden. Zuvor wurden am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie aus einem Spektrum von über 40 antimikrobiellen Verbindungen durch Struktur-Wirkungs-Analysen vier geeignete Peptidvarianten für eine Konservierung ausgewählt. Dazu zählten die zyklischen Hexapeptide WWW und WFW und die helikalen Magainin-Derivate IVWTI-M2a und MK5E.

Im Versuch A (Kap. 4.1) wurden zur Charakterisierung von Lagerungs- und Konzentrations-effekten jeweils neun Ejakulate in einem „*split-sample*“-Verfahren mit den Hexapeptiden (Kap. 2.4.3) WWW (2 und 4 µM) und WFW (4 und 8 µM) und den Magainin-Derivaten (Kap. 2.4.4) IVWTI-M2a (2,5 und 5 µM) und MK5E (1 und 2 µM) aufbereitet. Nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung wurde der Einfluss der AMP-Supplementierung im Vergleich zum Standardverdünner BTS + 544 µM Gentamicin analysiert. Die Peptidkonzentrationen bewegten sich im Bereich der einfachen und doppelten MIC (Kap. 3.1, Tabelle 1). Diese wurden am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) an zwei Laborstämmen (*E. coli* DH-5α, *B. subtilis* DSM 347) bestimmt [79, 183].

Im Versuch B (Kap. 4.2) wurden mittels computerassistierter Spermienmotilitätsanalyse die Effekte einer AMP-Supplementierung auf die Spermienmotilität in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration überprüft. Nach 24 Stunden Lagerung wurden dafür konservierte Ejakulate in einem „*split-sample*“-Verfahren mit steigenden Konzentrationen (5 - 40 µM) der Peptide WFW, WWW, MK5E (Kap. 3.1, Tabelle 1) und der fluoreszenzmarkierten Peptide WWW[F] und [F]-M2a (Kap. 3.8, Tabelle 11) für fünf Minuten inkubiert.

Ziel des Versuchs C (Kap. 4.3) war die Prüfung der Effekte des kombinierten Einsatzes des Antibiotikums Gentamicin mit den antimikrobiellen Peptiden WFW, WWW und MK5E. Die Peptide und deren Konzentrationen wurden durch die Versuche A und B festgelegt (4 µM WFW, 2 µM WWW und 1 µM MK5E). Unabhängig von den Ergebnissen der MIC-Bestimmung des Gentamicins (Kap. 4.1.6) wurde die Dosis in den kombinierten Varianten auf 34 µM reduziert. Es wurde an 20 Ejakulaten in einem „*split-sample*“-Verfahren untersucht, ob sich die einzelnen Varianten spermatologisch nach 12, 48 und 96 Stunden Lagerung vom Kontrollverdünner unterschieden.

Die mit den Peptiden konservierten Ejakulate wurden im Versuch A und C spermatologisch und mikrobiologisch untersucht. Zur Charakterisierung der Peptidwirkung auf die Spermienzelle wurden u.a. morphologische Untersuchungen an Spermien, computerassistierte Spermienmotilitätsanalysen, die Durchflusszytometrie, die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und die Elektronenspinresonanzspektroskopie genutzt. Die mikrobiologische Untersuchung umfasste eine Analyse des Keimspektrums sowie eine Prüfung der Resistenz ausgewählter Keime gegen die Peptide.

5.1 Auswirkungen verschiedener Peptide auf die Spermaqualität

Neben einer breiten antimikrobiellen Aktivität der AMP entscheidet vor allem die Spermientoxizität solcher Wirkstoffe über den Einsatz in Konservierungsmedien.

Im Rahmen der spermatologischen Untersuchung wurden kontinuierlich pH-Wert-Messungen durchgeführt (Kap. 4.1 und 4.3). Die Wasserstoffionenkonzentration des Mediums beeinflusst in erheblichem Maße die Motilität und den Stoffwechsel von Spermienzellen. Das Puffersystem im Verdünner wird besonders durch den CO₂-Gradienten zwischen dem BTS-Medium und der restlichen Luft in der Spermatube beeinträchtigt [372]. Weiterhin bestimmen Verschiebungen im pH-Wert entscheidend die Aktivität antimikrobiell wirksamer Substanzen [252, 266].

Für Eberspermien liegt der optimale pH-Wert im Bereich zwischen 7,0 - 7,5 [49]. In den Messungen wurde eine Erhöhung des pH-Wertes im Verdünnermedium bei Zusatz der verschiedenen Peptidvarianten festgestellt. Die pH-Wert-Erhöhung in den Versuchsvarianten lässt sich aus der Basizität der Peptide ableiten. Dagegen ist der pH-Wert-Anstieg über die Lagerungszeit auf die begrenzte Kapazität des Bikarbonat-Puffers zurückzuführen [373]. Demnach überschritt der pH-Wert erst nach 96 Stunden Lagerung den für Spermien physiologischen Bereich im Mittel um 0,1 Einheit [16, 49, 338].

In der mikroskopischen Untersuchung (Kap. 4.1) zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verringerung des Anteils an Spermien mit einem „Normalem Apikalen Rand“ (NAR), insbesondere für die beiden Magainin-Derivate IVWTI-M2a und MK5E. Gleiches galt für die MK5E-Variante im Versuch C (Kap. 4.3).

Durchflusszytometrisch wurden die Konzentrationseffekte verifiziert und höhere Anteile membran- und/oder akrosomgeschädigter Spermien sowohl für die helikalen Magainin-Derivate IVWTI-M2a und MK5E als auch für die zyklischen Hexapeptide WWW und WFW im höheren Konzentrationsbereich nachgewiesen (Kap. 4.1).

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen deuteten darauf hin, dass der größte Teil der avitalen Spermien gleichzeitig eine Störung der Membranen aufwies. Eine Störung der Mitochondrienaktivität (Kap. 4.3) als Ursache für einen spermiziden Effekt konnte in Anlehnung an die Ergebnisse von De Waal *et al.* (1991) nicht nachgewiesen werden [87]. Der Vitalitätsverlust gegenüber dem Standardverdünner BTS + 544 µM Gentamicin hielt sich bei niedrigen Konzentrationen der Hexapeptide (Kap. 4.1 und 4.2) WWW (2 µM) und WFW (4 µM) und in den kombinierten Varianten aus Peptid und Gentamicin (Kap. 4.3) in für die Praxis vertretbaren Grenzen. Insgesamt führte der Zusatz der Hexapeptidvarianten in höheren Konzentrationen gegenüber den Magainin-Derivaten zu geringeren Akrosomen- und Membranschäden.

Aus Bindungsstudien fluoreszenzmarkierter Peptide an Eberspermien wurden charakteristische Bindungsmuster abgeleitet (Kap. 4.4). Diese lieferten Informationen über die Verteilung und Affinität von AMP zu bestimmten Zellstrukturen der Spermien. Die Peptide, die für diesen Versuch eingesetzt wurden, unterschieden sich durch Kopplung der Fluoreszenzgruppe hinsichtlich Ladung und Amphipathie von den zyklischen und helikalen Ausgangspeptiden. Rückschlüsse über peptidabhängige Auswirkungen auf die Spermienzellmorphologie und den Wirkmechanismus der Ausgangspeptide waren daher nur eingeschränkt möglich.

Aus den Beobachtungen lässt sich dennoch folgern, dass grundsätzlich eine Peptid-Spermien-Interaktion bestand. Die fluoreszenzmarkierten Hexapeptide zeigten ein verstärktes Fluoreszenzsignal an der Insertion zwischen Kopf und Mittelstück. Dagegen wiesen die Magainin-Derivate eine hohe Affinität zum akrosomalen Bereich des Kopfes und zum Mittelstück der Spermien auf (Mitochondrienscheide). Die Peptidstruktur beeinflusste demnach die Lokalisation der Konjugate an verschiedenen Membrankompartimenten und

kann wahrscheinlich auch für eine unterschiedliche biologische Aktivität der Peptide verantwortlich gemacht werden.

Die durch die computerassistierte Spermienmotilitätsanalyse (CASA) erhobenen Daten belegten, dass die Peptide im Versuch A (Kap. 4.1) gegenüber der Kontrolle mit Gentamicinzusatz über die Lagerungszeit keinen Einfluss auf den Prozentsatz progressiv motiler Spermien (PROG P) ausübten.

Im Versuch B (Kap. 4.2) wurden die Kurzzeiteffekte steigender Konzentrationen der AMP mittels CASA überprüft. Hervorzuheben war hier der positive Einfluss des Hexapeptids WFW auf den Anteil aktiv vorwärts beweglicher Spermien (PROG P). Weiterhin ließ sich aus der Motilitätsanalyse folgern, dass die Konzentration der AMP einen entscheidenden Einfluss auf die Bewegungsform der Spermien hatte. In der Regel lag ein Konzentrationsoptimum vor. Eine weitere Konzentrationssteigerung hatte allgemein einen negativen Einfluss auf die Motilität. Die Kopplung der Fluoreszenzgruppe an die Peptide beeinträchtigte zusätzlich das Bewegungsmuster der Spermien, da fluoreszenzmarkierte und nichtmarkierte Peptide verschiedene Bewegungsmuster zeigten. Deutlich wurde der negative Effekt auf die Motilität bei den Magainin-Derivaten [297]. Die durchschnittlichen Gesamtgeschwindigkeiten (PROG VAP) und die gemittelten Bahnen (PROG DAP) progressiv motiler Spermien wurden teilweise peptid- und konzentrationsabhängig negativ beeinflusst. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Lagerungseffekte konnte im Versuch B von vornherein ausgeschlossen werden. Trotzdem muss die Frage gestellt werden, ob die schlechteren Motilitätswerte in Gegenwart der Magainine durch Bakterien oder durch die Peptide verursacht wurden [95, 99, 109, 297, 335]. Diese Frage wird durch den Konzentrationsversuch beantwortet, da hier der direkte Peptideffekt durch die Kurzzeitinkubation überprüft und nicht durch eine bakterielle Besiedlung überlagert werden konnte.

Weiterhin konnte in den Versuchen A und B (Kap. 4.1 und 4.2) beobachtet werden, dass die zyklischen Hexapeptide, darunter besonders WFW die Linearität (PROG LIN) und infolgedessen den Anteil linear progressiv motiler Spermien (LIN P) erhöhten. In höheren Konzentrationen wurde die seitliche Kopfauslenkungsamplitude (PROG ALH) verringert (Kap. 4.1 und 4.2) und gleichzeitig die Schlagfrequenz (PROG BCF) erhöht (Kap. 4.2). Daraus resultierte, dass sich die geradlinig bewegliche Spermienpopulation nach WFW-Supplementation mit einer höheren Durchschnittsgeschwindigkeit (LIN VAP) vorwärts bewegte (Kap. 4.1 und 4.2). Den gleichen, jedoch stärker ausgeprägten Effekt einer Linearitätssteigerung der Spermienbewegung bewirkte eine längere Inkubation der Spermien im Thermoresistenztest (TRT) bei 38 °C. Die längere Inkubation bei 38 °C entspricht dabei den Gegebenheiten im weiblichen Genitaltrakt. Inwiefern das verstärkte Fluoreszenzsignal in den Bindungsstudien der carboxyfluoreszeinmarkierten Hexapeptide an der Insertion zwischen Kopf und Mittelstück die Linearitätssteigerung erklären kann oder ob diese in einem ursächlichen Zusammenhang stehen, kann nicht beantwortet werden (Kap. 4.4). Dessen ungeachtet kann aber die Stimulierung der Geradlinigkeit der Spermienbewegung (PROG LIN) durch WFW möglicherweise funktionell positiv gewertet werden (Kap. 4.1 und 4.2). Untersuchungen von Coronel *et al.* (1990) am Hausmeerschweinchen (*Cavia porcellus*) ergaben, dass ein basisches Seminalplasmaprotein (Caltrin) im akrosomalen Bereich und im Schwanzbereich der Spermien bindet. Das Protein wird auch in der Samenblasendrüse bei Ebern und Bullen gebildet. Es reguliert den Kalziumeinstrom in die Zelle. Die Forschergruppe stellte fest, dass eine Behandlung von Spermien mit Caltrin zu einer ähnlichen Motilitäts- und Linearitätssteigerung in der Spermienbewegung führte [65, 66].

Über die Elektronenspinresonanzspektroskopie war es möglich, die Peptid-Spermien-Interaktion auf Membranebene zu charakterisieren (Kap. 4.5). Lipide grenzen, als Grundbestandteil der Membranen, Zellen von ihrer Umgebung ab. Neben der lateralen Verteilung der Lipide spielt auch die transversale Asymmetrie eine wichtige Rolle. Die Aminophospholipide sind sehr heterogen angeordnet. Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) findet man zu 96% bzw. zu 80% in der zytoplasmatischen

Hälfte der eukaryotischen Membran. Die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) sind zu 70% bzw. zu 90% in der äußeren Lamelle angereichert [406].

In der Phospholipidzusammensetzung der Spermienzellmembran ist der Anteil von PC verdoppelt, während SM, PE und PS einen geringeren Anteil der Membranphospholipide ausmachen. Unter Annahme einer ungerichteten transversalen Diffusion und einer annähernd gleichen Anzahl von Lipidplätzen in beiden Membranhälften wird die Phospholipidasymmetrie durch eine Aminophospholipid-Translokase aufrecht-erhalten [242].

Um eine mögliche Wechselwirkung der Peptide mit der Spermienzellmembran zu charakterisieren, wurden spinmarkierte Phospholipidanaloga (SL-PC, SL-PS, SL-SM) in die Zellmembran von Eberspermien eingebaut [242]. Diese sind in ihren Eigenschaften den natürlichen Phospholipiden ähnlich. Der Einbau der Phospholipidanaloga in die Spermienmembran erfolgte bei Raumtemperatur [182]. Die Korrelationszeiten (τ_c) wurden in Annäherung an ein isotropes System als empirisches Maß für die Bewegungsfreiheit und Rotationsgeschwindigkeit der Label aus den Membranspektren berechnet. Eine geringe Korrelationszeit entspricht einer größeren Fluidität in der unmittelbaren Nachbarschaft des Markers (Mikrofluidität).

Die Hexapeptidvarianten WFW und WWW bewirkten eine Verbreiterung der ESR Spektren bzw. eine Erhöhung der Korrelationszeiten, die eine Immobilisierung des SL-PC in der Spermienzellmembran kennzeichneten. Durch Zusatz von MK5E verringerte sich hingegen die Korrelationszeit. Die Spermienzellmembran wurde fluidier, was auch nach Zusatz von IVWTI-M2a gefunden wurde. Um eventuelle synergistische, antibakterielle Wirkungen aufzuzeigen, wurden die ESR-Spektren in Gegenwart von Gentamicin und WFW aufgezeichnet. Für alle verwendeten Label wurde eine deutlichere Immobilisierung gemessen als mit WFW allein. Die Auswirkungen der Peptidzusätze auf die Rotationsbeweglichkeit der spinmarkierten Phospholipidanaloga waren bei SL-SM und SL-PC gegenüber SL-PS stärker ausgeprägt. Der fluidisierende Effekt von MK5E blieb gegenüber SL-PS gänzlich aus. Demnach sprechen die ESR-Untersuchungen für eine Wechselwirkung der Peptide vornehmlich mit Lipiden auf der exoplasmatischen Membranhälfte [118, 246, 257].

Eine Kopfgruppenspezifität der Peptid-Lipid-Interaktion konnte ausgeschlossen werden, da die Peptide mit allen Labeln im BTS-Verdüner ohne Spermien in Wechselwirkung traten. Um eine Aussage zur Bindungsaffinität bzw. zur Reversibilität der Wechselwirkung von Peptiden und Spermienzellmembran treffen zu können, wurden SL-PC- und SL-SM-markierte Spermien nach der Messung mit den Peptiden mit BTS gewaschen, in BTS ohne Peptide resuspendiert und erneut vermessen. Im Fall der zyklischen Hexapeptide war der immobilisierende Effekt fast vollständig aufgehoben (Reversibilität). Dementsprechend ist die Rigidifizierung der Zellmembran an die Gegenwart dieser Peptide geknüpft und deren Bindungsaffinität an die Membran gering. Der fluidisierende Effekt des MK5E blieb dagegen weitgehend erhalten (Irreversibilität). Die Reversibilität bzw. Irreversibilität der Peptideffekte kam sehr deutlich im Thermoresistenztest (TRT) der Motilitätsanalyse zum Tragen.

Die ESR-Spektren und die Motilitätsparameter könnten in engerem Zusammenhang stehen. Eine rigidere Spermienzellmembran nach Inkubation mit WFW könnte der Grund dafür sein, dass sich die seitliche Kopfauslenkungsamplitude der Spermien (PROG ALH) verringerte und gleichzeitig die Geradlinigkeit der Spermienbahn (PROG LIN) erhöhte. Dagegen wirkte eine Inkubation mit MK5E membranfluidisierend, mit der Folge einer höheren Kopfauslenkungsamplitude (PROG ALH, Kap. 4.2). Parallel dazu stieg die durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeit (PROG VAP) an. Dies kann als Hinweis auf kapazitationsähnliche Veränderungen gewertet werden.

Studien belegen, dass synthetische Moleküle in der Lage sind, detergenzähnlich einen Cholesterolefflux über der Spermienplasmamembran zu erzeugen [60, 321]. Eberspermien besitzen ein extrem niedriges Cholesterol/Phospholipidverhältnis (C/P) in der Zellmembran. Ein Entzug von Cholesterol aus der Zellmembran vermindert das C/P und stellt einen wesentlichen Bestandteil der Kapazitation dar [205]. Veränderungen der Lipidzusammen-

setzung können u.a. eine Fluidisierung und/oder ggf. eine Destabilisierung der Zellmembran verursachen. Aus diesem Zusammenhang heraus, könnte womöglich auch die erhöhte akrosomale Reaktivität bzw. Destabilisierung der akrosomalen Membranen in der vorliegenden Studie nach Magaininsupplementation erklärt werden [67, 99].

Als Schlussfolgerung der spermatologischen Analyse ergibt sich, dass die getesteten Peptide mit hoher Wahrscheinlichkeit auch mit der eukaryotischen Zellmembran der Spermien wechselwirkten, da es zu einer Schädigung der Zellen kam, die sich jedoch bei niedrigen Konzentrationen von WWW (2 μM) und WFW (4 μM) in vertretbaren Grenzen hielt.

Besonders hervorzuheben ist die Kombination aus dem Peptid WFW (4 μM) und Gentamicin (34 μM), die einen positiven Einfluss auf den Anteil aktiv vorwärts beweglicher Spermien (PROG P), linear beweglicher Spermien (LIN P) und unbeweglicher Spermien (IMMOT P) im TRT nach 300-minütiger Inkubation ausübte.

5.2 Antimikrobielle Wirksamkeit verschiedener Peptide

Bereits nach den ersten Untersuchungen wurde deutlich, dass der Keimgehalt im Sperma starken Schwankungen unterworfen ist, die vom Einzeltier, der Spermagewinnung und Spermaverarbeitung mitbestimmt werden [6].

Die in den Untersuchungen im Nativsperma (Versuch A, Kap. 4.1) ermittelte aerobe Flora setzte sich aus 11 Gattungen gramnegativer und 9 Gattungen grampositiver Keime zusammen. Dabei dominierten Hautbesiedler und Fäkalkontaminanten. Der Hauptteil der gefundenen Bakterien gehörte zur Familie Enterobacteriaceae mit *Proteus* als häufigstem Vertreter. Zu den gleichen Ergebnissen kamen Althouse *et al.* (2005).

Das verdünnte Ebersperma (BTS + 544 μM Gentamicin) zeigte eine deutlich andere Gewichtung der Gattungen bzw. Arten als das native. Auffällig waren die verringerte Bandbreite des Keimspektrums und die Abnahme der Nachweishäufigkeit eines großen Teils davon. Die Keimreduktion erfasste vor allem den grampositiven Teil des Spektrums. *Proteus* ssp. konnten nicht nachgewiesen werden. Die in den meisten nativen Proben vorkommenden Corynebakterien wurden in ca. zwei Drittel der ausschließlich mit Gentamicin verdünnten Proben eliminiert.

In den mit Peptidvarianten konservierten Spermaproben (Versuch A, Kap. 4.1) wurde eine Zunahme des Keimspektrums im Vergleich zum Standardverfahren BTS + 544 μM Gentamicin beobachtet. Als so genannte „Problemkeime“ wurden an erster Stelle *Proteus*-Spezies angesehen. Die Anwesenheit resistenter Keime in den zugrunde liegenden Untersuchungen, wie *Ralstonia pickettii*, *Providencia rettgeri*, *Burkholderia cepacia* und *Stenotrophomonas maltophilia*, lässt auf ein Missverhältnis zwischen eingesetzter AMP-Konzentration und Ausgangskeimgehalt im nativen Ejakulat schließen. Die meisten dieser multiresistenten Erreger wurden aber auch von anderen Autoren im verdünnten Ebersperma isoliert [6, 55, 74, 342, 384].

Die recht große Gruppe der unspezifischen Mischflora zeigte sich unempfindlich. Einige Wissenschaftler weisen auf das Problem der Unwirksamkeit polykationischer Peptide hin. Sie führen Veränderungen der äußeren Membranbestandteile, die einer Initialbindung der Peptide entgegenwirken, als Hauptgrund für die Resistenz an. Häufig sind auch enzymatische Inaktivierungen der AMP Gegenstand der Diskussion [31, 276].

Bei Anwendung des Standardverfahrens BTS + 544 μM Gentamicin waren 23% der Proben nach 96 Stunden Lagerung ohne nachweisbaren Keimgehalt. Die maximale Menge an KbE ml^{-1} betrug weniger als 10^4 . Das entsprach einer guten mikrobiologischen Spermaqualität. Bei Verwendung der antimikrobiellen Peptide war die nachgewiesene Lebendkeimzahl nach 48 Stunden Lagerung vergleichbar mit der Standardverdünnung BTS + 544 μM Gentamicin. Nach 96 Stunden stieg die Anzahl an KbE ml^{-1} in den Verdünnungen mit

WWW und WFW um den Faktor 10, bei Anwendung von IVWTI-M2a um den Faktor 100 und MK5E erbrachte einen Anstieg der KbE ml⁻¹ um den Faktor 1000 verglichen mit dem Standardverfahren (Versuch A, Kap. 4.1).

Um die Wirksamkeit der Peptide gegenüber den ausgewählten Bakterienstämmen zu überprüfen, wurden zwei unterschiedliche Nährmedien genutzt. Zur Anwendung kamen das Luria-Bertani-Medium und das kationenausgeglichene Mueller-Hinton-II-Bouillon-Wachstumsmedium. Die Ergebnisse der Versuche A und C (Kap. 4.1 und 4.3) zeigten, dass das Wachstumsmedium entscheidend die Wirksamkeit der Testsubstanzen beeinflusste. Eine hohe Wirksamkeit des Gentamicins konnte in den Untersuchungen bestätigt werden. Alle untersuchten Stämme waren gegenüber Gentamicin empfindlich. So wurde in den Tests zur minimalen Hemmstoffkonzentration (Versuch A, Kap. 4.1) in Abhängigkeit vom Medium MICs ermittelt, die teilweise 100fach unter der routinemäßig eingesetzten Dosis von 544 µM lagen.

Betrachtet man die Ergebnisse (Versuch A, Kap. 4.1) der verschiedenen Peptidvarianten an den aus Ebersperma isolierten Bakterienarten („Feldisolate“ oder Wildtypstämme), so fällt auf, dass die ermittelten MICs im Vergleich zu den Laborstämmen *E. coli* DH-5α und *B. subtilis* DSM 347 wesentlich höher lagen. Für die beiden *Proteus*-Arten konnte bis zu einer Konzentration von 100 µM und höher keine Wachstumshemmung festgestellt werden. Eine hohe Resistenzrate von *Proteus*-Stämmen gegenüber konventionellen Antibiotika wurde schon in früheren Arbeiten beschrieben [74, 336, 347, 377].

Da das verwendete Nährmedium die Ergebnisse stark beeinflusste, stellt sich die Frage, welches Testverfahren angewandt werden sollte. Nach CLSI-Standards muss MHIIB verwendet werden, da bestimmte Antibiotika in ihrer Wirkung stark vom pH-Wert abhängig sind [252, 266, 378]. Auch der Gehalt an Substanzen im Medium wie z.B. Thymidin oder Thymin kann zu einer Aufhebung der hemmenden Wirkung bestimmter Antibiotika führen, was zu einer Einstufung von Keimen als resistent führen könnte [42].

Welches Testverfahren *in vitro* verwendet werden sollte, muss mit entsprechenden Fachkollegen diskutiert werden. Es erscheint wichtig, für solche Versuche ein Kontrollsystem zu etablieren, das regelmäßig validiert und evaluiert wird, da das verwendete Medium die Ergebnisse stark beeinträchtigte. Mit dem Verfahren nach CLSI und den dort vorgegebenen Referenzstämmen steht ein solches System zur Verfügung [378]. Besagte Referenzstämme sind eingehend untersucht, ihre Eigenschaften bekannt. Trotzdem wurden zusätzlich aus Ebersperma isolierte Wildtypstämme verwendet, deren Eigenschaften in Bezug auf möglicherweise vorhandene Resistenzmechanismen nicht bekannt sind. Im Vergleich zum *E. coli*-Referenzstamm reagierten diese Wildtyp-*E. coli*-Stämme unterschiedlich. Daraus ergaben sich zwangsläufig Schwierigkeiten in der Interpretation der Reaktionen innerhalb einer Bakterienart gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen.

In der Literatur wird darauf verwiesen, dass AMP an Bakterien in einem System „vergleichbar mit dem Wirtssystem“ und nicht an Bakterien in Kulturmedien getestet werden sollten. Dorschner *et al.* (2006) konnten zeigen, dass das Mikromilieu, insbesondere Natriumbikarbonat, eine natürlich in der Säugetierzelle vorkommende Puffersubstanz, die Wirkung von AMP beeinflusste [96]. Natriumbikarbonat ist ein wesentlicher Bestandteil des BTS-Verdünnens [179]. Ein weiterer wichtiger Zusatz des Standardverdünners ist Ethylendiamintetraacetat (EDTA). EDTA potenziert als Verdünnerbestandteil die Wirkung der poly-kationischen Aminoglycosidantibiotika. Es wirkt indirekt antimikrobiell [44]. Divalente Kationen stabilisieren das LPS der bakteriellen Membranen. Werden sie über Chelatkomplexe gebunden, so kann die natürliche Barrierefunktion der äußeren Bakterienmembran nicht mehr aufrechterhalten werden [89, 218, 255, 256]. Dagegen verursacht ein hoher Anteil divalenter Kationen eine drastische Erhöhung der MIC des eingesetzten Antibiotikums. Im Seminalplasma des Ebers sind große Mengen solcher Kationen enthalten [228, 252].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass im CLSI-Standardverfahren die elektrostatischen Wechselwirkungen der Peptide mit ihren Zielmembranen in einem kationengesättigten Umfeld deutlich an Kraft verlieren, da gerade die kationische Komponen-

te der Peptide Grundlage der Coulombschen Wechselwirkung mit der bakteriellen Membran ist [101]. Anders verhält es sich im BTS-Verdünner, der eine niedrige Ionenstärke aufweist [179].

Ziel des Versuchs C (Kap. 4.3) war es, zu untersuchen, ob bei gleichzeitiger Anwendung von Gentamicin und den synthetisch hergestellten antimikrobiellen Peptiden möglicherweise synergistische Effekte zu beobachten sind [75, 152, 361, 363, 396, 416]. Im Vergleich zur Anwendung von Gentamicin oder dem antimikrobiellen Peptid „alleine“ würde man in diesem Fall gleiche mikrobiologische Ergebnisse bei einer reduzierten Konzentration der einzelnen Komponenten erwarten. Bei Anwendung von Gentamicin und WWW sowie MK5E in MHIIB reduzierte sich die MIC für Gentamicin gegenüber *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* und *Proteus myxofaciens*. Bezogen auf die anderen Bakterien verschob sich die MIC nur geringfügig. Insgesamt gesehen, lagen die MIC-Werte für Gentamicin und die Kombination aus Gentamicin und Peptid im gleichen Bereich, so dass sich die Frage ergibt, ob der bakterizide Effekt auf die alleinige Wirkung von Gentamicin zurückgeführt werden kann.

Unabhängig von der Methode (LB-Medium vs. MHIIB) ist die für alle vier Peptide ermittelte MIC für die Anwendung im Sperma nicht geeignet, da die spermatologisch akzeptable Konzentration wesentlich niedriger lag. Trotz alledem scheint eine Wirkung der AMP in der angewandten niedrigen Konzentration im Sperma zu bestehen. Das zeigt sich in den Werten im Versuch C für die Keimbelastung nach 48 und 96 Stunden Lagerung (Kap. 4.3). Verglichen mit dem Standardverfahren BTS + 544 μM Gentamicin führte die alleinige Reduktion der Gentamicinkonzentration von 544 μM auf 34 μM bereits nach 48 Stunden Lagerung zu einem deutlichen Anstieg der Keimzahl von 10^3 auf 10^8 KbE ml^{-1} . Bei Anwendung der Kombination von Gentamicin in niedriger Konzentration (34 μM) und den Peptiden WFW oder WWW zeigten sich im Vergleich zum Standardverfahren gute Ergebnisse, die aber in den Versuchen zur MIC-Bestimmung, wie oben diskutiert, nicht bestätigt werden konnten.

Erstaunlicherweise reduzierte sich die Keimzahl bei Verwendung von Gentamicin (34 μM) und WFW (4 μM) in der Konservierung im Vergleich zum Gentamicin (34 μM) ohne Peptid nach 48 Stunden Lagerung um den Faktor 10^5 bzw. nach 96 Stunden Lagerung um den Faktor 10^4 (Kap. 4.3). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Laborergebnisse könnte sein, dass die im Sperma vorkommende unspezifische Begleit- oder Mischflora, die überwiegend aus grampositiven Bakterien der Haut- und Urogenitalflora besteht, kompetitiv verdrängt wurde und sich nur „Problemkeime“ im Wachstum durchsetzten. Weiterhin gibt es in der Literatur Hinweise auf synergistische und antagonistische Wirkungen von Bakterien untereinander [15, 52, 116, 133, 364].

Genauso denkbar wäre es, dass die Peptide in geringen Konzentrationen eine bakterio-statische Wirkung besitzen und eine bakterielle Vermehrung durch eine einfache mechanische Hinderung der Zellteilung in den Spermaportionen unterbunden wurde. Der Aspekt, dass die Peptide in der mikrobiologischen Untersuchung im Plattenverfahren ausverdünnt wurden und so eine Revitalisierung der Bakterien folgte, darf ebenso nicht außer Acht gelassen werden.

5.3 Abschließende Bewertung und Ausblick

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Ansicht, dass die getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe allein nicht in der Lage sind, die Keimvermehrung im Sperma völlig zu unterbinden. Einen wesentlichen Beitrag zur Verringerung des Keimeintrags und zur Absicherung der Spermaproduktion liefern Hygienemaßnahmen im Rahmen des Qualitätsmanagements in den einzelnen Besamungsstationen.

Erfolg versprechend erscheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit die weiterführende Untersuchung des kombinierten Einsatzes von WFW bzw. WWW und Gentamicin, zwei

keimhemmende Stoffe, die sich im BTS-Verdünner in ihrer Wirkung ergänzen. Eine Dosisreduktion von Gentamicin als Folge eines kombinierten Einsatzes mit anderen Wirkstoffen im Verdünner wäre ein erster Schritt zur Entwicklung von sinnvollen Alternativen für die Flüssigkonservierung von Ebersperma. Durch eine Dosisreduktion steigt die Gefahr der Resistenzbildung. Daher sind zur Klärung der Wirkungsweise und Synergiemechanismen und damit auch der Anwendungsmöglichkeiten weiterführende Untersuchungen notwendig. Möglicherweise wären Strukturmodifikationen der Peptide sinnvoll. Ein Vorbild ist das im männlichen Genitaltrakt natürlich vorkommende β -Defensin [120, 173, 215, 397, 404, 409, 418].

Hilfreich wäre, die Synthese der Hexapeptide voranzutreiben und in einem größeren industriellen Maßstab zu realisieren. Darüber hinaus ist eine Optimierung des Verdünners hinsichtlich Elektrolyt-, EDTA- und Natriumbikarbonatkonzentration vorstellbar. Ziel ist es, ein Milieu zu schaffen, in dem die einzelnen Komponenten so aufeinander abgestimmt sind, dass die antimikrobielle Wirksamkeit, die auf den amphipathischen Eigenschaften der Peptide aufbaut, maximiert und die potenziellen Synergien voll ausgeschöpft werden.

In einem weiterführenden Projekt wird der Einfluss bakterieller Spaltprodukte auf die Spermaqualität des Ebers unter verschiedenen Konservierungsbedingungen beleuchtet werden. Im Blickpunkt steht die Neutralisierung von LPS durch antimikrobielle Peptide.

Es ist denkbar, dass die Entwicklung von Kälteschutzmitteln so weit voranschreitet, dass die Lagerung des Eberspermas in einem Temperaturbereich von unter 10 °C zur Praxisreife gelangt [8]. Eine Temperaturabsenkung würde eine Verschiebung des Keimspektrums zu Gunsten psychrophiler Keime bewirken [9]. Dann könnte die Wirksamkeit der AMP erneut überprüft werden. Vergleichbare Studien zu einer temperaturabhängigen Wirkung konventioneller Antibiotika wurden bereits durchgeführt [160, 270, 385].

6 Zusammenfassung

Die Wirkung antimikrobieller Peptide (AMP) bei der Konservierung von Ebersperma

Antibiotika sind für die Flüssigkonservierung von Sperma von herausragender Bedeutung. Aufgrund der rasanten und weltweiten Entwicklung von Antibiotikaresistenzen im verdünnten Sperma besteht die Notwendigkeit, Alternativen zu konventionellen Wirkstoffen zu entwickeln. Die Anwendung antimikrobieller, synthetischer Peptide als Verdünnerzusatz stellt ein Novum für die Reproduktionsbiologie dar. Die Arbeit dokumentiert Versuche, in denen zyklische Hexapeptide, helikale Magainin-Derivate und Kombinationen aus Gentamicin und Peptiden in einem „*split-sample*“-Verfahren zur Flüssigkonservierung von Eberspermien bei 16 °C aufbereitet und mit dem Kontrollverdünner Beltswille Thawing Solution + 544 µM Gentamicin verglichen wurden.

Die spermatologische Untersuchung ergab, dass die getesteten Peptide mit der eukaryotischen Spermienmembran interagierten. Es kam peptid- und konzentrationsabhängig zu einer Schädigung der Zellen. Der Vitalitätsverlust gegenüber dem Standardverfahren hielt sich bei niedrigen Konzentrationen der Hexapeptide WFW (4 µM) und WWW (2 µM) und im kombinierten Einsatz mit Gentamicin (34 µM) in für die Praxis vertretbaren Grenzen. Durch Verwendung der Elektronenspinresonanzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Peptide vornehmlich mit Lipiden auf der exoplasmatischen Membranhälfte in Wechselwirkung treten. Die Hexapeptidzusätze bewirkten eine reversible Immobilisierung des spinmarkierten Fettsäurelipids Phosphatidylcholin in der Spermienzellmembran. Der Zusatz des Magainins MK5E führte zu einer irreversiblen Membranfluidisierung. Bindungsstudien fluoreszenzmarkierter Peptide an Eberspermien mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie zeigten, dass beide Peptidgruppen unterschiedliche, aber typische Lokalisationsmuster aufwiesen.

Unabhängig vom mikrobiologischen Untersuchungsmedium war die für alle vier Peptide an den bakteriellen Referenz- (nach CLSI M31-A2), Labor- und Wildtypstämmen ermittelte minimale inhibitorische Konzentration für die Anwendung im Sperma nicht geeignet, da die spermatologisch akzeptable Konzentration wesentlich niedriger lag. Die kombinierte Anwendung einer reduzierten Gentamicinkonzentration in Verbindung mit den Peptiden WFW oder WWW in der Spermakonservierung reduzierte die mikrobiologische Belastung der Proben auf ein mit dem Kontrollverdünner vergleichbares Niveau. Dagegen führte Gentamicin in geringer Konzentration (34 µM) ohne Peptidzusatz zu einem deutlichen Anstieg der Keimzahl.

Erfolg versprechend erscheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit die weiterführende Untersuchung des kombinierten Einsatzes von 4 µM WFW bzw. 2 µM WWW und Gentamicin.

7 Summary

Effect of antimicrobial peptides (AMP) in boar sperm preservation

Antibiotics are essential components of semen extenders to control bacterial contamination and growth. Galloping worldwide resistance to conventional antibiotics in semen extenders requires the development of alternative solutions to common antibiotics. Therefore, cationic antimicrobial peptides attract central interest as a novel class of antimicrobial additives in boar sperm preservation. The present study investigates the spermatological and microbiological effects of cyclic hexapeptides and helical magainin derivatives on boar sperm conservation during semen storage at 16 °C. Combinations of the standard antibiotic gentamicin with single peptides were also tested and compared to the control extender beltswille thawing solution + 544 µM gentamicin. The ejaculates were prepared in a *split-sample* process.

Spermatological examination revealed interaction of the tested peptides with eukaryotic membranes of sperm cells as well as peptide and concentration-dependent negative effects on spermatozoa. However, in low peptide concentrations of the cyclic hexapeptides WFW (4 µM) or WWW (2 µM), alone or in combination with a reduced gentamicin (34 µM) concentration, the total amount of damaged cells remained in a range comparable to the control extender. Electron spin resonance spectroscopy detected differential interactions of the peptides with different lipids, in particular in the outer leaflet of the sperm membrane. Cyclic hexapeptides reversibly immobilized the spin-labelled phosphatidylcholin. By contrast, magainin MK5E caused irreversible membrane fluidization. Confocal Laser-Scanning-Microscopy with fluorescein-labelled peptides showed staining patterns typical for each group of peptides.

Independent of the microbiological culture medium, minimal inhibitory peptide concentrations specified for reference strains (according to CLSI M31-A2), laboratory strains, and wild-type strains of bacteria were not suitable for use in sperm preservation due to lower than acceptable concentration values for spermatology. Combined application of peptides WFW or WWW and reduced gentamicin concentration (34 µM) in BTS produced microbiological results comparable to the control extender. Furthermore, bacterial contamination in low gentamicin-concentrated semen (34 µM), without peptides, were found to be high compared to the control extender.

In summary, synergism of 4 µM WFW or 2 µM WWW and gentamicin provide a promising basis for further investigation of peptide antibiotic-based media for boar sperm preservation.

8 Literaturverzeichnis

1. **Aamdal J, Hogset I, Sveberg O, Koppang N (1958)** A new type of artificial vagina and a new collection technique for boar semen. *J Am Vet Med Assoc* 132:101-104.
2. **Abaigar T, Holt WV, Harrison RA, del Barrio G (1999)** Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod* 60:32-41.
3. **Ahmad I, Perkins WR, Lupan DM, Selsted ME, Janoff AS (1995)** Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with *in vivo* antifungal activity. *Biochem Biophys Acta* 1237:109-114.
4. **Akhter S, Ansari MS, Andrabi SM, Ullah N, Qayyum M (2008)** Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Reprod Domest Anim* 43:272-278.
5. **Althouse GC (2008)** Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod Domest Anim* 43:374-378.
6. **Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM (2000)** Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53:1167-1176.
7. **Althouse GC, Lu KG (2005)** Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63:573-584.
8. **Althouse GC, Pierdon MS, Lu KG (2008)** Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology* 70:1317-1323.
9. **Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M (1998)** Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 50: 535-543.
10. **Andersson E, Sorensen OE, Frohm B, Borregaard N, Egesten A, Malm J (2002)** Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. *Hum Reprod* 17:2529-2534.
11. **Andreu D, Rivas L (1998)** Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47:415-433.
12. **Andrushchenko VV, Aarabi MH, Nguyen LT, Prenner EJ, Vogel HJ (2008)** Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes. *Biochem Biophys Acta* 1778:1004-1014.
13. **Andrushchenko VV, Vogel HJ, Prenner EJ (2006)** Solvent-dependent structure of two tryptophan-rich antimicrobial peptides and their analogs studied by FTIR and CD spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1758:1596-1608.
14. **Aneas SB, Gary BG, Bouvier BP (2008)** Collectis(R) automated boar collection technology. *Theriogenology* 70:1368-1373.
15. **Anguige K, King JR, Ward JP (2005)** Modelling antibiotic- and antiquorum sensing treatment of a spatially-structured *Pseudomonas aeruginosa* population. *J Math Biol* 51:557-594.
16. **Appell RA, Evans PR (1978)** The effect of temperature on sperm motility. Is bacterial growth a factor? *Fertil Steril* 30:436-438.
17. **Appelt C (2006)** Arginin- und tryptophanreiche antimikrobielle Peptide - Struktur, Funktion und Entwicklung nicht-peptidischer Analoga. FU Berlin.
18. **Appelt C, Schrey AK, Soderhall JA, Schmieder P (2007)** Design of antimicrobial compounds based on peptide structures. *Bioorg Med Chem Lett* 17:2334-2337.
19. **Appelt C, Wessolowski A, Soderhall JA, Dathe M, Schmieder P (2005)** Structure of the antimicrobial, cationic hexapeptide cyclo(RRWRF) and its analogues in solution and bound to detergent micelles. *ChemBiochem* 6:1654-1662.
20. **Aranha C, Gupta S, Reddy KV (2004)** Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: *in vitro* and *in vivo* studies. *Contraception* 69:333-338.

21. **Arienti G, Carlini E, Palmerini CA (1997)** Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. *J Membr Biol* 155:89-94.
22. **Auger J, Ronot X, Dadoune JP (1989)** Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J Androl* 10:439-448.
23. **Aurich C, Spergser J (2007)** Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology* 67:912-918.
24. **Auroux MR, Jacques L, Mathieu D, Auer J (1991)** Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an *in-vitro* study in man with *Escherichia coli*. *Int J Androl* 14:264-270.
25. **Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, Jacob LS (1993)** Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Res* 53:3052-3057.
26. **Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM (1998)** Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102:874-880.
27. **Barratt CL, Tomlinson MJ, Cooke ID (1993)** Prognostic significance of computerized motility analysis for *in vivo* fertility. *Fertil Steril* 60:520-525.
28. **Basu S, Radziejewska-Lebrecht J, Mayer H (1986)** Lipopolysaccharide of *Providencia rettgeri*. Chemical studies and taxonomical implications. *Arch Microbiol* 144:213-218.
29. **Bayer AS, Prasad R, Chandra J, Koul A, Smriti M, Varma A, Skurray RA, Firth N, Brown MH, Koo SP, Yeaman MR (2000)** *In vitro* resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. *Infect Immun* 68:3548-3553.
30. **Beard SJ, Ciccognani DT, Hughes MN, Poole RK (1992)** Metal ion-catalysed hydrolysis of ampicillin in microbiological growth media. *FEMS Microbiol Lett* 75:207-211.
31. **Belas R, Manos J, Suvanasuthi R (2004)** *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect Immun* 72:5159-5167.
32. **Benachir T, Lafleur M (1995)** Study of vesicle leakage induced by melittin. *Biochim Biophys Acta* 1235:452-460.
33. **Berger T (1990)** *Pisum sativum* agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology* 33:689-695.
34. **Beveridge TJ, Graham LL (1991)** Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev* 55:684-705.
35. **Beyerbach M, Waberski D (1996)** Anmerkungen zur statistischen Auswertung von 'Split-Sample'-Versuchen über den Einfluss unterschiedlicher Behandlungen auf die Samenqualität. *Reprod Domest Anim* 31:353-358.
36. **Blondelle SE, Takahashi E, Dinh KT, Houghten RA (1995)** The antimicrobial activity of hexapeptides derived from synthetic combinatorial libraries. *J Appl Bacteriol* 78:39-46.
37. **Blottner S, Wegner I, Roelants H, Jewgenow K (1998)** Bestimmung der Akrosomintegrität von Spermien. *Tierärztl. Umschau* 53:441-447.
38. **Boll M, Radziejewska-Lebrecht J, Warth C, Krajewska-Pietrasik D, Mayer H (1994)** 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose in LPS of enterobacterial R-mutants and its possible role for their polymyxin reactivity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 8:329-341.
39. **Boman HG (1995)** Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13:61-92.
40. **Boman HG (2003)** Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 254:197-215.
41. **Boman HG, Steiner H (1981)** Humoral immunity in *Cecropia pupae*. *Curr Top Microbiol Immunol* 94-95:75-91.
42. **Borderon E, Horodniceanu T (1978)** Metabolically deficient dwarf-colony mutants of *Escherichia coli*: deficiency and resistance to antibiotics of strains isolated from urine culture. *J Clin Microbiol* 8:629-634.
43. **Bourinbaier AS, Lee CH (1996)** Synergistic effect of gramicidin and EDTA in inhibiting sperm motility and cervical mucus penetration *in vitro*. *Contraception* 54:367-72.

44. **Branen JK, Davidson PM (2004)** Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Int J Food Microbiol* 90:63-74.
45. **Breitbart H (2002)** Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 187:139-144.
46. **Brogden KA (2005)** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238-250.
47. **Budworth PR, Amann RP, Chapman PL (1988)** Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 9:41-54.
48. **Bulet P, Stocklin R, Menin L (2004)** Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198:169-184.
49. **Busch W, Löhle K, Peter W (1982)** Künstliche Besamung bei Nutztieren. 1.Auflage, Jena: Gustav-Fischer-Verlag:364-428.
50. **Caballero I, Vazquez JM, Garcia EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Martinez EA (2008)** Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* 70:1352-1355.
51. **Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompard CM, Alberti S, Bengoechea JA (2004)** Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 72:7107-7114.
52. **Carbonell X, Corchero JL, Cubarsi R, Vila P, Villaverde A (2002)** Control of *Escherichia coli* growth rate through cell density. *Microbiol Res* 157:257-265.
53. **Centola GM (1998)** Dose-response effects of gramicidin-D, EDTA, and nonoxynol-9 on sperm motion parameters and acrosome status. *Contraception* 58:35-38.
54. **Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ (2006)** Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1758:1184-1202.
55. **Chansilpa T (1987)** Die Bedeutung von Keimgehalt und Antibiotikazusatz für die Haltbarkeit von Schweinefrischsperma bei 15 °C. Tierärztliche Hochschule Hannover.
56. **Chen LB (1988)** Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol* 4:155-181.
57. **Cheng FP, Fazeli A, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B (1996)** Use of *peanut* agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl* 17:674-682.
58. **Chin GJ, Marx J (1994)** Resistance to Antibiotics. *Science* 264:359.
59. **Chitnis SN, Prasad KS (1990)** Seminalplasmin, an antimicrobial protein from bovine seminal plasma, inhibits peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 60:281-284.
60. **Choi YH, Toyoda Y (1998)** Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biol Reprod* 59:1328-1333.
61. **Clara A, Manjramkar DD, Reddy VK (2004)** Preclinical evaluation of magainin-A as a contraceptive antimicrobial agent. *Fertil Steril* 81:1357-1365.
62. **Colenbrander B, Feitsma H, Grooten HJ (1993)** Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J Reprod Fertil Suppl* 48:207-215.
63. **Conover WJ (1999)** Practical nonparametric statistics. 3rd ed, John Wiley & Sons: 369-381.
64. **Conrad F, Kolitsch, Letz W, Klaas U (1992)** Spermagewinnung beim Eber - mittels künstlicher Vagina oder per Hand? *SUS - Schweinezucht und Schweinemast* 40:11.
65. **Coronel CE, Lardy HA (1992)** Functional properties of caltrin proteins from seminal vesicle of the guinea pig. *Mol Reprod Dev* 33:74-80.
66. **Coronel CE, San Agustin J, Lardy HA (1990)** Purification and structure of caltrin-like proteins from seminal vesicle of the guinea pig. *J Biol Chem* 265:6854-6859.
67. **Cross NL (1999)** Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. *Mol Reprod Dev* 53:92-98.
68. **Cross NL, Meizel S (1989)** Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 41:635-641.

69. **Cruciani RA, Barker JL, Zasloff M, Chen HC, Colamonici O (1991)** Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3792-3796.
70. **D'Cruz OJ, Haas GG (1996)** Fluorescence-labeled fucolectins are superior markers for flow cytometric quantitation of the human sperm acrosome reaction. *Fertil Steril* 65:843-851.
71. **D'Cruz OJ, Pereira HA, Haas GG (1995)** Sperm immobilizing activity of a synthetic bioactive peptide 20-44 of 37-kDa cationic antimicrobial protein (CAP37) of human neutrophils. *J Androl* 16:432-440.
72. **Dagnall GJR (1986)** An investigation of the bacterial flora of the preputial diverticulum and of the semen of boars. Royal Veterinary College: Hertfordshire.
73. **Dagnall GJR, Jones JET (1985)** Bacterial contamination of boar semen. *Proceedings 5th congress of the International Society for Animal Hygiene* 1:412-416.
74. **Danowski KM (1989)** Qualitative und quantitative Untersuchung zum Keimgehalt von Ebersperma und zur Antibiotikaempfindlichkeit des überwiegenden Keimspektrums (unter dem Aspekt der Samenkonservierung). Tierärztliche Hochschule Hannover.
75. **Darveau RP, Cunningham MD, Seachord CL, Cassiano-Clough L, Cosand WL, Blake J, Watkins CS (1991)** Beta-lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1153-1159.
76. **Darzynkiewicz Z, Traganos F, Staiano-Coico L, Kapuscinski J, Melamed MR (1982)** Interaction of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res* 42:799-806.
77. **Dathe M, Meyer J, Beyermann M, Maul B, Hoischen C, Bienert M (2002)** General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochem Biophys Acta* 1558:171-186.
78. **Dathe M, Nikolenko H, Klose J, Bienert M (2004)** Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine- and tryptophan-containing hexapeptides. *Biochemistry* 43:9140-9150.
79. **Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M (2001)** Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 501:146-1450.
80. **Dathe M, Schumann M, Wieprecht T, Winkler A, Beyermann M, Krause E, Matsuzaki K, Murase O, Bienert M (1996)** Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry* 35:12612-12622.
81. **Dathe M, Wieprecht T (1999)** Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1462:71-87.
82. **Dathe M, Wieprecht T, Nikolenko H, Handel L, Maloy WL, MacDonald DL, Beyermann M, Bienert M (1997)** Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett* 403:208-212.
83. **Davies J (1996)** Bacteria on the rampage. *Nature* 383:219-220.
84. **Davis RO, Katz DF (1992)** Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl* 13:81-86.
85. **Davis RO, Katz DF (1993)** Operational standards for CASA instruments. *J Androl* 14:385-94.
86. **de Smit AJ, Bouma A, Terpstra C, van Oirschot JT (1999)** Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. *Vet Microbiol* 67:239-249.
87. **de Waal A, Vaz Gomes A, Mensink A, Grootegoed JA, Westerhoff HV (1991)** Magainins affect respiratory control, membrane potential and motility of hamster spermatozoa. *FEBS Lett* 293:219-223.

88. **de Winter PJ, Verdonck M, de Kruif A, Devriese LA, Haesebrouck F (1994)** Influence of the oestrous cycle on experimental intrauterine *E. coli* infection in the sow. Zentralbl Veterinärmed A 41:640-644.
89. **Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J (1996)** Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie Van Leeuwenhoek 69:193-202.
90. **Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A (1996)** Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. J Biol Chem 271:18188-18193.
91. **Deslouches B, Phadke SM, Lazarevic V, Cascio M, Islam K, Montelaro RC, Mietzner TA (2005)** De novo generation of cationic antimicrobial peptides: influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity. Antimicrob Agents Chemother 49:316-322.
92. **Devine DA, Hancock RE (2002)** Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance. Curr Pharm Des 8:703-714.
93. **Dias CP, Castagna CD, Reis GR, Simonetti R, Bortolozzo FP, Wentz IVO, Cardoso M (2000)** Degree of bacterial contamination of swine ejaculate submitted to two hygienic and collection methods. Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS 28:32-40.
94. **Didion BA (2008)** Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. Theriogenology 70:1374-1376.
95. **Diemer T, Weidner W, Michelmann HW, Schiefer HG, Rován E, Mayer F (1996)** Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. Int J Androl 19:271-277.
96. **Dorschner RA, Lopez-Garcia B, Peschel A, Kraus D, Morikawa K, Nizet V, Gallo RL (2006)** The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. Faseb J 20:35-42.
97. **Dubiel A, Stanczyk JF, Krolinski J, Fronczek T, Furmanski K, Ciszewski J (1981)** Bacterial flora of boars ejaculate. Medycyna Weterynaryjna 37:486-489.
98. **Duclouhier H, Molle G, Spach G (1989)** Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers. Biophys J 56:1017-1021.
99. **Edelstein MC, Gretz JE, Bauer TJ, Fulgham DL, Alexander NJ, Archer DF (1991)** Studies on the *in vitro* spermicidal activity of synthetic magainins. Fertil Steril 55:647-649.
100. **Eibl K, Zonder HF, Hahn R (1962)** Zur Bedeutung des Keimbefalls in Ebersamen nach Verdünnung mit eidotterhaltigen Puffer. Zuchthygiene 6:294-304.
101. **Epand RM, Vogel HJ (1999)** Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. Biochim Biophys Acta 1462:11-28.
102. **Ernst RK, Guina T, Miller SI (1999)** How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. J Infect Dis 179:326-330.
103. **Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR (1982)** Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. J Histochem Cytochem 30:279-280.
104. **Falla TJ, Hancock RE (1997)** Improved activity of a synthetic indolicidin analog. Antimicrob Agents Chemother 41:771-775.
105. **Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock RE (1996)** Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. J Biol Chem 271:19298-19303.
106. **Farchione LA (1981)** Inactivation of aminoglycosides by penicillins. J Antimicrob Chemother 8 Suppl A:27-36.
107. **Farlin ME, Jasko DJ, Graham JK, Squires EL (1992)** Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. Mol Reprod Dev 32:23-27.
108. **Fellmann P, Zachowski A, Devaux PF (1994)** Synthesis and use of spin-labeled lipids for studies of the transmembrane movement of phospholipids. Methods Mol Biol 27:161-175.

109. **Fernandez A, Cruz E, Lazo L, Arredondo C, Brito A (2001)** Bacteriological study of porcine semen. The preliminary evaluation of the lectin effect of *Escherichia coli* on spermatic agglutination. *Revista de Salud Animal* 23:73-79.
110. **Finlay BB, Hancock RE (2004)** Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat Rev Microbiol* 2:497-504.
111. **Foley CW, Zehmer RB, Shotts EB, Jr., Williams DJ (1971)** Bacterial flora of boar reproductive tract and semen. *Am J Vet Res* 32:1447-1450.
112. **Foxcroft GR, Dyck MK, Ruiz-Sanchez A, Novak S, Dixon WT (2008)** Identifying useable semen. *Theriogenology* 70:1324-1336.
113. **Fraser LR (2008)** The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology* 70:1356-1359.
114. **Frey HH, Löscher W (2002)** Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Stuttgart: Ferdinand-Enke-Verlag.
115. **Friedrich C, Scott MG, Karunaratne N, Yan H, Hancock RE (1999)** Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1542-1548.
116. **Fulghesu L, Giallorenzo C, Savoia D (2007)** Evaluation of different compounds as quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chemother* 19:388-391.
117. **Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP (1996)** Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 50:727-751.
118. **Gadella BM, Miller NG, Colenbrander B, van Golde LM, Harrison RA (1999)** Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Mol Reprod Dev* 53:108-125.
119. **Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M (2002)** Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 110:823-831.
120. **Ganz T (2003)** Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-20.
121. **Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI (1990)** Defensins. *Eur J Haematol* 44:1-8.
122. **Garcia A, Sierra MF, Friberg J (1981)** Survival of bacteria after freezing of human semen in liquid nitrogen. *Fertil Steril* 35:549-551.
123. **Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM (1986)** Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod* 34:127-38.
124. **Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE (1997)** Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 57:1401-1406.
125. **Gennaro R, Zanetti M, Benincasa M, Podda E, Miani M (2002)** Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr Pharm Des* 8:763-778.
126. **Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Del Prete MS, Scalise G (1999)** Antimicrobial activity of polycationic peptides. *Peptides* 20:1265-1273.
127. **Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Scalise G (2000)** *In-vitro* activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 38:115-118.
128. **Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, Paggi AM, D'Errico MM, Scalise G (2000)** Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Peptides* 21:1155-1160.
129. **Gilbert P, Moore LE (2005)** Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 99:703-715.
130. **Gillan L, Evans G, Maxwell WM (2005)** Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63:445-457.
131. **Ginsburg KA, Moghissi KS, Abel EL (1988)** Computer-assisted human semen analysis. Sampling errors and reproducibility. *J Androl* 9:82-90.

132. **Giroir BP, Quint PA, Barton P, Kirsch EA, Kitchen L, Goldstein B, Nelson BJ, Wedel NJ, Carroll SF, Scannon PJ (1997)** Preliminary evaluation of recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in children with severe meningococcal sepsis. *Lancet* 350:1439-1443.
133. **Gonzalez JE, Keshavan ND (2006)** Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:859-875.
134. **Gough M, Hancock RE, Kelly NM (1996)** Antidotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun* 64:4922-4927.
135. **Graham AE, Speicher E, Williamson B (1997)** Analysis of gentamicin sulfate and a study of its degradation in dextrose solution. *J Pharm Biomed Anal* 15:537-543.
136. **Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH (1990)** Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43:55-64.
137. **Greube A, Muller K, Topfer-Petersen E, Herrmann A, Muller P (2001)** Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes. *Biochemistry* 40:8326-8334.
138. **Groisman EA (1994)** How bacteria resist killing by host-defense peptides. *Trends Microbiol* 2:444-449.
139. **Groisman EA, Kayser J, Soncini FC (1997)** Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J Bacteriol* 179:7040-7045.
140. **Guina T, Yi EC, Wang H, Hackett M, Miller SI (2000)** A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* 182:4077-4086.
141. **Gunn JS (2001)** Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J Endotoxin Res* 7:57-62.
142. **Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M, Miller SI (1998)** Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 95:189-198.
143. **Guraya SS (2000)** Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *Int Rev Cytol* 199:1-64.
144. **Guthrie HD, Welch GR, Long JA (2008)** Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology* 70:1209-1215.
145. **Haines TH (1983)** Anionic lipid headgroups as a proton-conducting pathway along the surface of membranes: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:160-164.
146. **Hamil KG, Liu Q, Sivashanmugam P, Yenugu S, Soundararajan R, Grossman G, Richardson RT, Zhang YL, O'Rand MG, Petrusz P, French FS, Hall SH (2002)** Cystatin 11: a new member of the cystatin type 2 family. *Endocrinology* 143:2787-2796.
147. **Hammami-Hamza S, Doussau M, Bernard J, Rogier E, Duquenne C, Richard Y, Lefevre A, Finaz C (2001)** Cloning and sequencing of SOB3, a human gene coding for a sperm protein homologous to an antimicrobial protein and potentially involved in zona pellucida binding. *Mol Hum Reprod* 7:625-632.
148. **Hammerstedt RH, Amann RP, Rucinsky T, Morse PD, Jr., Lepock J, Snipes W, Keith AD (1976)** Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membranes of bovine sperm: effect of butylated hydroxytoluene and cold shock. *Biol Reprod* 14:381-397.
149. **Hammerstedt RH, Keith AD, Snipes W, Amann RP, Arruda D, Griel LC (1978)** Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolality on sperm. *Biol Reprod* 18:686-696.
150. **Hancock JL (1957)** The morphology of boar spermatozoa. *J R Microsc Soc* 76:84-97.
151. **Hancock RE (1997)** Peptide antibiotics. *Lancet* 349:418-422.
152. **Hancock RE (1998)** The therapeutic potential of cationic peptides. *Expert Opin Investig Drugs* 7:167-174.
153. **Hancock RE (1999)** Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs* 57:469-473.

154. **Hancock RE, Chapple DS (1999)** Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1317-1323.
155. **Hancock RE, Diamond G (2000)** The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 8:402-410.
156. **Hancock RE, Patrzykat A (2002)** Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2:79-83.
157. **Hancock RE, Rozek A (2002)** Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett* 206:143-149.
158. **Harrison RA, Vickers SE (1990)** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 88:343-352.
159. **Haug BE, Svendsen JS (2001)** The role of tryptophan in the antibacterial activity of a 15-residue bovine lactoferricin peptide. *J Pept Sci* 7:190-196.
160. **Hegde SS, Dam TK, Brewer CF, Blanchard JS (2002)** Thermodynamics of aminoglycoside and acyl-coenzyme A binding to the *Salmonella enterica* AAC(6')-ly aminoglycoside N-acetyltransferase. *Biochemistry* 41:7519-7527.
161. **Helmuth R, Protz D (1997)** How to modify conditions limiting resistance in bacteria in animals and other reservoirs. *Clin Infect Dis* 24 Suppl 1:136-138.
162. **Henley N, Baron C, Roberts KD (1994)** Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain. *Int J Androl* 17:78-84.
163. **Holt C, Holt WV, Moore HD, Reed HC, Curnock RM (1997)** Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl* 18:312-323.
164. **Holt W, Watson P, Curry M, Holt C (1994)** Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril* 62:1277-1282.
165. **Houghten RA, Pinilla C, Blondelle SE, Appel JR, Dooley CT, Cuervo JH (1991)** Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* 354:84-86.
166. **Huang HJ, Ross CR, Blecha F (1997)** Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol* 61:624-629.
167. **Huang HW (2000)** Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39:8347-8352.
168. **Huttner KM, Bevins CL (1999)** Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 45:785-94.
169. **Imura Y, Choda N, Matsuzaki K (2008)** Magainin 2 in Action: Distinct Modes of Membrane Permeabilization in Living Bacterial and Mammalian Cell. *Biophys J* 95:5757-5765.
170. **Isaacson RE (2003)** MBI-226. Micrologix/Fujisawa. *Curr Opin Investig Drugs* 4:999-1003.
171. **Jacob L, Zasloff M (1994)** Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin. *Ciba Found Symp* 186:197-216 (216-223).
172. **Jakic D, Valter D (1989)** Bacteriologic flora of native dissolved or frozen boar semen. *Veterinarski Glasnik* 43:557-562.
173. **Jalkanen J, Huhtaniemi I, Poutanen M (2005)** Discovery and characterization of new epididymis-specific beta-defensins in mice. *Biochem Biophys Acta* 1730:22-30.
174. **Jean-Francois F, Elezgaray J, Berson P, Vacher P, Dufourc EJ (2008)** Pore formation induced by an antimicrobial peptide: electrostatic effects. *Biophys J* 95: 5748-5756.
175. **Jenssen H, Hamill P, Hancock RE (2006)** Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19:491-511.
176. **Jeulin C, Lewin LM, Chevrier C, Schoevaert-Brossault D (1996)** Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: manual and computer-aided image analysis. *Cell Motil Cytoskeleton* 35:147-161.
177. **Jing W, Hunter HN, Hagel J, Vogel HJ (2003)** The structure of the antimicrobial peptide Ac-RRWWRF-NH₂ bound to micelles and its interactions with phospholipid bilayers. *J Pept Res* 61:219-229.

178. **Johnson JA (2002)** Nosocomial infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 32:1101-26.
179. **Johnson LA, Aalbers JG, Grooten HJG (1988)** Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM) or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthygiene* 23:49-55.
180. **Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM (2000)** Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
181. **Jones R (1998)** Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the *epididymis*. *J Reprod Fertil Suppl* 53:73-84.
182. **Joseph J, Lai CS (1988)** Synthesis of a spin-labeled phospholipid for studying membrane dynamics in intact mammalian cells. *J Lipid Res* 29:1101-1104.
183. **Junkes C, Wessolowski A, Farnaud S, Evans RW, Good L, Bienert M, Dathe M (2008)** The interaction of arginine- and tryptophan-rich cyclic hexapeptides with *Escherichia coli* membranes. *J Pept Sci* 14:535-543.
184. **Juretic D, Chen HC, Brown JH, Morell JL, Hendler RW, Westerhoff HV (1989)** Magainin 2 amide and analogues. Antimicrobial activity, membrane depolarization and susceptibility to proteolysis. *FEBS Lett* 249:219-223.
185. **Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ (1997)** Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J Antimicrob Chemother* 40:615-621.
186. **Kamp G, Busselmann G, Jones N, Wiesner B, Lauterwein J (2003)** Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. *Reproduction* 126:517-525.
187. **Kamysz W (2005)** Are antimicrobial peptides an alternative for conventional antibiotics? *Nucl Med Rev Cent East Eur* 8:78-86.
188. **Kamysz W, Okroj M, Lukasiak J (2003)** Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol* 50:461-469.
189. **Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K (2002)** Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* 4:97-103.
190. **Kauffold J, Melzer F, Henning K, Schulze K, Leiding C, Sachse K (2006)** Prevalence of *chlamydiae* in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 65:1750-1758.
191. **Knox R, Levis D, Safranski T, Singleton W (2008)** An update on North American boar stud practices. *Theriogenology* 70:1202-1208.
192. **Kobayashi S, Hirakura Y, Matsuzaki K (2001)** Bacteria-selective synergism between the antimicrobial peptides alpha-helical magainin 2 and cyclic beta-sheet tachyplesin I: toward cocktail therapy. *Biochemistry* 40:14330-14335.
193. **Kobisch M, Renaudin H, Madec F, Abiven P, Bebear C, Morvan P, Labbe A, Paboeuf F, Le menec M, Moizan C (1989)** Study on the possible presence of *ureaplasma* in the genital tract of sows and in semen of boars. *Recueil de Medecine Veterinaire de d'Ecole d'Alfort* 165:39-43.
194. **Koczulla AR, Bals R (2003)** Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* 63:389-406.
195. **Kohn FM, Erdmann I, Oeda T, el Mulla KF, Schiefer HG, Schill WB (1998)** Influence of urogenital infections on sperm functions. *Andrologia* 30 Suppl 1:73-80.
196. **Kolitsch G, Stähr B (1973)** Technologie und Arbeitsorganisation der Haltung von Besamungsebern, der Spermaproduktion sowie des Spermaeinsatzes unter den Bedingungen der Flüssigkonservierung von Ebersperma (Forschungsabschlussbericht). HU Berlin.
197. **Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle IS (2002)** Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet Scand* 43:49-55.
198. **Koppang N, Filseth O (1958)** The bacteriological flora of semen and prepuce in boars. *Nord. Veterinaermed* 10:603-609.

199. **Kornberg RD, McConnell HM (1971)** Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2564-2568.
200. **Koterba A, Torchia J, Silverthorne C, Ramphal R, Merritt AM, Manucy J (1986)** Nosocomial infections and bacterial antibiotic resistance in a university equine hospital. *J Am Vet Med Assoc* 189:185-191.
201. **Kozumplik J (1975)** Effect of the standard of hygiene in the care for breeding boars and of the technic of semen collection on the number of pathogens in the boar ejaculate. *Vet Med (Praha)* 20:519-525.
202. **Kristian SA, Datta V, Weidenmaier C, Kansal R, Fedtke I, Peschel A, Gallo RL, Nizet V (2005)** D-alanylation of teichoic acids promotes group A *Streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J Bacteriol* 187:6719-6725.
203. **Kurz A, Viertel D, Herrmann A, Muller K (2005)** Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction* 130: 615-626.
204. **Lai R, Zheng YT, Shen JH, Liu GJ, Liu H, Lee WH, Tang SZ, Zhang Y (2002)** Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. *Peptides* 23:427-435.
205. **Langlais J, Kan FW, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD (1988)** Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res* 20:185-201.
206. **Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC (1995)** Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 63:1291-1297.
207. **Lehrer RI, Ganz T (1999)** Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 11:23-27.
208. **Lellbach C (2008)** Einfluss der Spermagewinnungsmethode auf die Spermaqualität von Ebern und die Produktionseffizienz in Besamungsstationen. Tierärztliche Hochschule Hannover.
209. **Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ (2006)** Antimicrobial peptides in action. *J Am Chem Soc* 128:12156-12161.
210. **Levis DG, Reicks DL (2005)** Assessment of sexual behavior and effect of semen collection pen design and sexual stimulation of boars on behavior and sperm output--a review. *Theriogenology* 63:630-642.
211. **Levy O (2000)** Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood* 96:2664-2672.
212. **Levy SB, Marshall B (2004)** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10:122-129.
213. **Lewis K (1994)** Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem Sci* 19:119-123.
214. **Li J, Post M, Volk R, Gao Y, Li M, Metais C, Sato K, Tsai J, Aird W, Rosenberg RD, Hampton TG, Sellke F, Carmeliet P, Simons M (2000)** PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 6:49-55.
215. **Li P, Chan HC, He B, So SC, Chung YW, Shang Q, Zhang YD, Zhang YL (2001)** An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* 291:1783-1785.
216. **Livermore DM (2004)** The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 4:1-9.
217. **Livermore DM (2005)** Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 5:450-459.
218. **Loh B, Grant C, Hancock RE (1984)** Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 26:546-551.
219. **Lohner K, Blondelle SE (2005)** Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb Chem High Throughput Screen* 8:241-256.
220. **Lopez-Exposito I, Pellegrini A, Amigo L, Recio I (2008)** Synergistic effect between different milk-derived peptides and proteins. *J Dairy Sci* 91:2184-2189.

221. **Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW (1996)** Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 35:13723-13728.
222. **Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruif A, Van Soom A (2008)** Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology* 70:1337-13345.
223. **Malm J, Sorensen O, Persson T, Frohm-Nilsson M, Johansson B, Bjartell A, Lilja H, Stahle-Backdahl M, Borregaard N, Egesten A (2000)** The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect Immun* 68:4297-4302.
224. **Maloy WL, Kari UP (1995)** Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* 37:105-22.
225. **Manniello JM, Heymann H, Adair FW (1978)** Resistance of spheroplasts and whole cells of *Pseudomonas cepacia* to polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother* 14:500-504.
226. **Marion D, Zasloff M, Bax A (1988)** A two-dimensional NMR study of the antimicrobial peptide magainin 2. *FEBS Lett* 227:21-26.
227. **Marx U, Lassmann G, Wimalasena K, Muller P, Herrmann A (1997)** Rapid kinetics of insertion and accessibility of spin-labeled phospholipid analogs in lipid membranes: a stopped-flow electron paramagnetic resonance approach. *Biophys J* 73:1645-1654.
228. **Massanyi P, Trandzik J, Nad P, Toman R, Skalicka M, Korenekova B (2003)** Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian J Androl* 5:101-104.
229. **Matsuzaki K (1998)** Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochem Biophys Acta* 1376:391-400.
230. **Matsuzaki K (1999)** Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochem Biophys Acta* 1462:1-10.
231. **Matsuzaki K, Sugishita K, Fujii N, Miyajima K (1995)** Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* 34:3423-3429.
232. **Mazurova J, Vinter P (1991)** The effect of selected antibiotics on microorganisms contaminating boar ejaculate. *Vet Med (Praha)* 36:213-223.
233. **Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000)** Innate immunity. *N Engl J Med* 343:338-344.
234. **Miyasaki KT, Lehrer RI (1998)** Beta-sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *Int J Antimicrob Agents* 9:269-280.
235. **Miyazaki R, Fukuda M, Takeuchi H, Itoh S, Takada M (1990)** Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Arch Androl* 25:243-251.
236. **Monga M, Roberts JA (1994)** Spermagglutination by bacteria: receptor-specific interactions. *J Androl* 15:151-156.
237. **Morrot G, Herve P, Zachowski A, Fellmann P, Devaux PF (1989)** Aminophospholipid translocase of human erythrocytes: phospholipid substrate specificity and effect of cholesterol. *Biochemistry* 28:3456-3462.
238. **Mortimer ST (1997)** A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* 3:403-439.
239. **Mortimer ST, Schevaert D, Swan MA, Mortimer D (1997)** Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. *Hum Reprod* 12:1006-1012.
240. **Mosca DA, Hurst MA, So W, Viajar BS, Fujii CA, Falla TJ (2000)** IB-367, a protegrin peptide with *in vitro* and *in vivo* activities against the microflora associated with oral mucositis. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1803-1808.
241. **Muino R, Tamargo C, Hidalgo CO, Pena AI (2008)** Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci* 109:27-39.
242. **Muller K, Labbe C, Zachowski A (1994)** Phospholipid transverse asymmetry in trout spermatozoa plasma membrane. *Biochem Biophys Acta* 1192:21-26.
243. **Muller K, Muller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C (2008)** Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of *rainbow trout* spermatozoa. *Biol Reprod* 78:390-399.

244. **Muller K, Pomorski T, Marienfeld K, Herrmann A, Muller P (1996)** Transverse mobility of aminophospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Pflugers Arch* 431:255-256.
245. **Muller K, Pomorski T, Muller P, Herrmann A (1997)** The use of spin-labelled phospholipid analogues to characterize the transverse distribution of phospholipids and the activity of phospholipase-A2 in the cell membrane of bull spermatozoa. *Adv Exp Med Biol* 424:243-244.
246. **Muller K, Pomorski T, Muller P, Zachowski A, Herrmann A (1994)** Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry* 33:9968-9974.
247. **Muller P, Schiller S, Wieprecht T, Dathe M, Herrmann A (2000)** Continuous measurement of rapid transbilayer movement of a pyrene-labeled phospholipid analogue. *Chem Phys Lipids* 106:89-99.
248. **Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW (1993)** Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 155:408-413.
249. **Murtaugh RJ, Mason GD (1989)** Antibiotic pressure and nosocomial disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 19:1259-1274.
250. **Mystkowska ET, Niemierko A, Komar A, Sawicki W (2001)** Embryotoxicity of magainin-2-amide and its enhancement by cyclodextrin, albumin, hydrogen peroxide and acidification. *Hum Reprod* 16:1457-1463.
251. **Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM (2003)** A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod* 68:1828-1835.
252. **Nanavaty J, Mortensen JE, Shryock TR (1998)** The effects of environmental conditions on the *in vitro* activity of selected antimicrobial agents against *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 36:212-215.
253. **Nathan C (2004)** Antibiotics at the crossroads. *Nature* 431:899-902.
254. **Nikaido H (1996)** Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 178:5853-5859.
255. **Nikaido H (2003)** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593-656.
256. **Nikaido H, Vaara M (1985)** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49:1-32.
257. **Nolan JP, Magargee SF, Posner RG, Hammerstedt RH (1995)** Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry* 34:3907-3915.
258. **Nos-Barbera S, Portoles M, Morilla A, Ubach J, Andreu D, Paterson CA (1997)** Effect of hybrid peptides of cecropin A and melittin in an experimental model of bacterial keratitis. *Cornea* 16:101-106.
259. **O'Connell M, McClure N, Lewis SE (2002)** The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 17:704-709.
260. **Ochsendorf FR (1999)** Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 5:399-420.
261. **Oehlke J, Scheller A, Wiesner B, Krause E, Beyermann M, Klauschütz E, Melzig M, Bienert M (1998)** Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochem Biophys Acta* 1414:127-139.
262. **Ohsaki Y, Gazdar AF, Chen HC, Johnson BE (1992)** Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 52:3534-3538.
263. **Ojcius DM, Young JD (1991)** Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem Sci* 16:225-229.
264. **Op den Kamp JA (1979)** Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* 48:47-71.

265. **Oren Z, Hong J, Shai Y (1997)** A repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity. *J Biol Chem* 272:14643-14649.
266. **Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y (1999)** Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 341:501-513.
267. **Oren Z, Shai Y (1998)** Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47:451-463.
268. **Otto M (2006)** Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. *Curr Top Microbiol Immunol* 306:251-258.
269. **Pandey RP, Singh BK (1997)** Bacterial flora in boar semen and their antibiotic sensitivity. *Indian Journal of Animal Sciences* 67:411-412.
270. **Papapetropoulou M, Rodopoulou G, Giannoulaki E, Stergiopoulos P (1994)** Effect of temperature on antimicrobial susceptibilities of *Pseudomonas* species isolated from drinking water. *J Chemother* 6:404-407.
271. **Paquette DW, Simpson DM, Friden P, Braman V, Williams RC (2002)** Safety and clinical effects of topical histatin gels in humans with experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 29:1051-1058.
272. **Paquette DW, Waters GS, Stefanidou VL, Lawrence HP, Friden PM, O'Connor SM, Sperati JD, Oppenheim FG, Hutchens LH, Williams RC (1997)** Inhibition of experimental gingivitis in *beagle dogs* with topical salivary histatins. *J Clin Periodontol* 24:216-222.
273. **Park CB, Kim HS, Kim SC (1998)** Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 244:253-257.
274. **Pereira HA, Moore P, Grammas P (1996)** CAP37, a neutrophil granule-derived protein stimulates protein kinase C activity in endothelial cells. *J Leukoc Biol* 60:415-422.
275. **Perenyi T, Arr M, Graber H (1974)** Interaction of penicillins and aminoglycoside antibiotics. *Orv Hetil* 115:1988-1991.
276. **Perron GG, Zasloff M, Bell G (2006)** Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc Biol Sci* 273:251-256.
277. **Peschel A (2002)** How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 10:179-186.
278. **Peschel A, Collins LV (2001)** Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* 22:1651-1659.
279. **Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, Kalbacher H, Nieuwenhuizen WF, Jung G, Tarkowski A, van Kessel KP, van Strijp JA (2001)** *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* 193:1067-1076.
280. **Peschel A, Sahl HG (2006)** The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:529-536.
281. **Piehl LL, Cisale H, Torres N, Capani F, Sterin-Speziale N, Hager A (2006)** Biochemical characterization and membrane fluidity of membranous vesicles isolated from boar seminal plasma. *Anim Reprod Sci* 92:401-410.
282. **Piers KL, Brown MH, Hancock RE (1994)** Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2311-2316.
283. **Piers KL, Hancock RE (1994)** The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 12:951-958.
284. **Pinto MMV, Ramalho S, Perestrelo-Vielra R, Rodrigues J (2000)** Microbiological profile of pure semen and seminal doses of boars used in artificial insemination in Portugal. *Veterinária Técnica* 10:24-28.

285. **Pomorski T, Muller P, Zimmermann B, Burger K, Devaux PF, Herrmann A (1996)** Transbilayer movement of fluorescent and spin-labeled phospholipids in the plasma membrane of human fibroblasts: a quantitative approach. *J Cell Sci* 109 3:687-698.
286. **Potecea E, Jacob J, Cojocaru F, Maxim F, Cristea G, Ghitonu P (2000)** Bacterial microflora from boar semen. Bacteria number reduction by the use of antibiotics. *Revista Româna de Medicina Veterinara* 10:151-156.
287. **Powers JP, Hancock RE (2003)** The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24:1681-1691.
288. **Projan SJ (2002)** New (and not so new) antibacterial targets - from where and when will the novel drugs come? *Curr Opin Pharmacol* 2:513-522.
289. **Projan SJ (2003)** Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr Opin Microbiol* 6:427-430.
290. **Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB (1972)** Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci* 34:278-283.
291. **Qu XD, Harwig SS, Oren AM, Shafer WM, Lehrer RI (1996)** Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to protegrins. *Infect Immun* 64:1240-1245.
292. **Quayle AJ (2002)** The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* 57:61-79.
293. **Raetz CR (1990)** Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 59:129-170.
294. **Rana FR, Macias EA, Sultany CM, Modzrakowski MC, Blazyk J (1991)** Interactions between magainin 2 and *Salmonella typhimurium* outer membranes: effect of lipopolysaccharide structure. *Biochemistry* 30:5858-5866.
295. **Reddy KV, Aranha C (2000)** Studies on safety aspects of contraceptive Magainin-A in rabbits. *Indian J Exp Biol* 38:1217-1221.
296. **Reddy KV, Aranha C, Gupta SM, Yedery RD (2004)** Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reproduction* 128:117-126.
297. **Reddy KV, Shahani SK, Meherji PK (1996)** Spermicidal activity of Magainins: *in vitro* and *in vivo* studies. *Contraception* 53:205-210.
298. **Reddy KV, Yedery RD, Aranha C (2004)** Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents* 24:536-547.
299. **Reden J, Durckheimer W (1979)** Aminoglycoside antibiotics. Chemistry, biochemistry, structure-activity relationships. *Top Curr Chem* 83:105-170.
300. **Reicks DL, Levis DG (2008)** Fertility of semen used in commercial production and the impact of sperm numbers and bacterial counts. *Theriogenology* 70:1377-1379.
301. **Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV, Lebleu B (2003)** Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 278:585-590.
302. **Rikmenspoel R (1982)** Ciliary contractile model applied to sperm flagellar motion. *J Theor Biol* 96:617-645.
303. **Robillard I, Meyer C, Ladame D, Cranz C, Clavert A (1993)** Seminal fluid, bacteria, and spermatozoa. *Contracept Fertil Sex* 21:380-381.
304. **Roca J, Vazquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martinez EA (2006)** Challenges in pig artificial insemination. *Reprod Domest Anim* 41: 43-53.
305. **Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Roca J, Pena FJ (2008)** Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 70:1242-1250.
306. **Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y (2006)** Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J Biol Chem* 281:1636-1643.
307. **Rossi LM, Rangasamy P, Zhang J, Qiu XQ, Wu GY (2008)** Research advances in the development of peptide antibiotics. *J Pharm Sci* 97:1060-1070.
308. **Rozalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K (1997)** Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:65-89.

309. **Sanocka D, Fraczek M, Jedrzejczak P, Szumala-Kakol A, Kurpisz M (2004)** Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *J Reprod Immunol* 62:111-124.
310. **Sanocka D, Jedrzejczak P, Szumala-Kaekol A, Fraczek M, Kurpisz M (2003)** Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *J Androl* 24:448-455.
311. **Sawicki W, Mystkowska ET (1999)** Contraceptive potential of peptide antibiotics. *Lancet* 353:464-465.
312. **Schibli DJ, Hwang PM, Vogel HJ (1999)** Structure of the antimicrobial peptide tritripticin bound to micelles: a distinct membrane-bound peptide fold. *Biochemistry* 38:16749-16755.
313. **Schievano E, Calisti T, Menegazzo I, Battistutta R, Peggion E, Mammi S, Palu G, Loregian A (2004)** pH-Dependent conformational changes and topology of a herpesvirus translocating peptide in a membrane-mimetic environment. *Biochemistry* 43:9343-9351.
314. **Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Bjorck L (2002)** Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* 46:157-168.
315. **Schroder JM (1999)** Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci* 56:32-46.
316. **Schuberth HJ, Taylor U, Zerbe H, Waberski D, Hunter R, Rath D (2008)** Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology* 70:1174-1181.
317. **Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB, Jr. (2002)** Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2129-2133.
318. **Scofield AM, Clegg FG, Lamming GE (1974)** Embryonic mortality and uterine infection in the pig. *J Reprod Fertil* 36:353-361.
319. **Seigneuret M, Devaux PF (1984)** ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3751-3755.
320. **Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang YQ, Smith W, Cullor JS (1992)** Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* 267:4292-4295.
321. **Shadan S, James PS, Howes EA, Jones R (2004)** Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 71:253-265.
322. **Shafer WM, Casey SG, Spitznagel JK (1984)** Lipid A and resistance of *Salmonella typhimurium* to antimicrobial granule proteins of human neutrophil granulocytes. *Infect Immun* 43:834-838.
323. **Shafer WM, Qu X, Waring AJ, Lehrer RI (1998)** Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1829-1833.
324. **Shai Y (1999)** Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462:55-70.
325. **Shai Y (2002)** Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66:236-248.
326. **Shai Y, Oren Z (2001)** From "carpet" mechanism to *de-novo* designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* 22:1629-1641.
327. **Sidorczyk Z, Zahringer U, Rietschel ET (1983)** Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* Re-mutant. *Eur J Biochem* 137:15-22.

328. **Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, Lupa B, Suder P, Silberring J, Reed M, Pohl J, Shafer W, McAleese F, Foster T, Travis J, Potempa J (2004)** Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4673-4679.
329. **Simmaco M, Mignogna G, Barra D (1998)** Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47:435-450.
330. **Singer SJ, Nicolson GL (1972)** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
331. **Som A, Tew GN (2008)** Influence of lipid composition on membrane activity of antimicrobial phenylene ethynylene oligomers. *J Phys Chem B* 112:3495-3502.
332. **Som A, Vemparala S, Ivanov I, Tew GN (2008)** Synthetic mimics of antimicrobial peptides. *Biopolymers* 90:83-93.
333. **Sone M (1990)** Investigations on the control of bacteria in boar semen. *Japanese Journal of Animal Reproduction* 36:23-30.
334. **Sone M, Chikyu M, Yoshida M, Bamba K, Ogasa A (1992)** Prolonged storage of boar semen in liquid form. *Japanese Journal of Swine Science* 29:41-50.
335. **Sone M, Kawarasaki T, Ogasa A, Nakahara T (1989)** Effects of bacteria-contaminated boar semen on the reproductive performance. *Japanese Journal of Animal Reproduction* 35:159-164.
336. **Sone M, Ohmura K, Bamba K (1982)** Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *Vet. Rec.* 111:11-14.
337. **Soravia E, Martini G, Zasloff M (1988)** Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett* 228:337-340.
338. **Stähr B, Nehring H (1997)** Handbook for Pig AI Centers. Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. (IFN).
339. **Stähr B, Rothe L, Waberski D (2009)** Empfehlungen zur Gewinnung, Aufbereitung, Lagerung und Transport von Ebersperma - Handbuch für Besamungsstationen. IFN Schönow/Tierärztliche Hochschule Hannover.
340. **Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR (1991)** Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 57:3613-3615.
341. **Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M (1997)** Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8686-8690.
342. **Strey A (1967)** Der Keimgehalt des Eberspermas und die Wirkung einiger antibakterieller Zusätze auf Spermaqualität und Keimgehalt. HU-Berlin.
343. **Strom MB, Haug BE, Skar ML, Stensen W, Stiberg T, Svendsen JS (2003)** The pharmacophore of short cationic antibacterial peptides. *J Med Chem* 46:1567-1570.
344. **Strom MB, Rekdal O, Svendsen JS (2002)** Antimicrobial activity of short arginine- and tryptophan-rich peptides. *J Pept Sci* 8:431-437.
345. **Sugimura K, Nishihara T (1988)** Purification, characterization, and primary structure of *Escherichia coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT. *J Bacteriol* 170:5625-5632.
346. **Takehima K, Chikushi A, Lee KK, Yonehara S, Matsuzaki K (2003)** Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *J Biol Chem* 278:1310-1315.
347. **Tamuli MK, Sharma DK, Rajkonwar CK (1984)** Studies on the microbial flora of boar semen. *Indian Veterinary Journal* 61:858-861.
348. **Tan YT, Tillett DJ, McKay IA (2000)** Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol Med Today* 6:309-314.
349. **Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME (2002)** Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 70:6524-6533.
350. **Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey JL (1999)** The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology* 52:447-459.
351. **Thacker BJ, Larsen RE, Joo HS, Leman AD (1984)** Swine diseases transmissible with artificial insemination. *J Am Vet Med Assoc* 185:511-516.

352. **Toke O (2005)** Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* 80:717-735.
353. **Tossi A, Sandri L, Giangaspero A (2000)** Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55:4-30.
354. **Trabi M, Craik DJ (2002)** Circular proteins--no end in sight. *Trends Biochem Sci* 27: 132-138.
355. **Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Franceschi C (1998)** Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res* 241:384-393.
356. **Tytler EM, Anantharamaiah GM, Walker DE, Mishra VK, Palgunachari MN, Segrest JP (1995)** Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry* 34:4393-4401.
357. **Tzeng YL, Ambrose KD, Zughaier S, Zhou X, Miller YK, Shafer WM, Stephens DS (2005)** Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 187:5387-5396.
358. **Ulvatne H, Haukland HH, Samuelsen O, Kramer M, Vorland LH (2002)** Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. *J Antimicrob Chemother* 50:461-467.
359. **Unger T, Oren Z, Shai Y (2001)** The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function, and model membrane interactions: implication to their mode of action. *Biochemistry* 40:6388-6397.
360. **Vaara M (1992)** Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 56:395-411.
361. **Vaara M, Porro M (1996)** Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1801-1805.
362. **Vaara M, Vaara T (1983)** Polycations as outer membrane-disorganizing agents. *Antimicrob Agents Chemother* 24:114-122.
363. **Vaara M, Vaara T (1983)** Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 24:107-113.
364. **Van Delden C, Iglewski BH (1998)** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 4:551-560.
365. **Van Eldere J (2003)** Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother* 51:347-352.
366. **Varner DD, Scanlan CM, Thompson JA, Brumbaugh GW, Blanchard TL, Carlton CM, Johnson L (1998)** Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology* 50:559-573.
367. **Viljanen P, Vaara M (1984)** Susceptibility of gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother* 25:701-705.
368. **Villegas J, Schulz M, Soto L, Sanchez R (2005)** Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis* 10:105-110.
369. **Visser LG, Hiemstra PS, van den Barselaar MT, Ballieux PA, van Furth R (1996)** Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect Immun* 64:1653-1658.
370. **Vogel HJ, Schibli DJ, Jing W, Lohmeier-Vogel EM, Eband RF, Eband RM (2002)** Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochem Cell Biol* 80:49-63.
371. **Vrba Z, Kozumplik J, Pokorny L, Jelinkova E (1970)** Comparison of bacterial content of the *preputial diverticulum* in boars with urine retention and those without liquid in preputial diverticulum. *Acta Veterinaria* 39:67-69.
372. **Vyt P, Maes D, Dejonckheere E, Castryck F, Van Soom A (2004)** Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim* 39:8-12.

373. **Vyt P, Maes D, Sys SU, Rijsselaere T, Van Soom A (2007)** Air contact influences the pH of extended porcine semen. *Reprod Domest Anim* 42:218-220.
374. **Waberski D, Dirksen G, Weitze KF, Leiding C, Hahn R (1990)** Field studies of the effect of sperm motility and morphology on the fertility of boars used for insemination. *Tierärztliche Praxis* 18:591-594.
375. **Waberski D, Petrunkina AM, Weitze KF, Töpfer-Petersen E (1999)** *In vitro* assessment of semen for the prediction of fertility. *Tierärztliche Praxis* 27:8-14.
376. **Waberski D, Petrunkina AM, Töpfer-Petersen E (2008)** Can external quality control improve pig AI efficiency? *Theriogenology* 70:1346-1351.
377. **Waltz FA, Foley CW, R. H, C.Tiffany L, W.Liska BJ (1968)** Bacteriological Studies of Boar Semen. *J. Anim. Sci.* 27:1357-1362.
378. **Watts JL, Shryock TR, Apley M, Bade DJ, Brown SD, Gray JT, Heine H, Hunter RP, Mevius DJ, Papich MG, Silley P, Zurenko GE (2008)** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From animals; approved Standard. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-document M31-A3).
379. **Wegener HC (2003)** Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol* 6:439-445.
380. **Weiner B, McNeely DJ, Kluge RM, andere u (1976)** Stability of gentamicin sulfate injection following unit dose repackaging. *Am J Hosp Pharm* 33:1254-1259.
381. **Wenzel RP (2004)** The antibiotic pipeline--challenges, costs, and values. *N Engl J Med* 351:523-526.
382. **Wessolowski A, Bienert M, Dathe M (2004)** Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, D-amino acid substitution and cyclization. *J Pept Res* 64:159-169.
383. **Westerhoff HV, Zasloff M, Rosner JL, Hendler RW, De Waal A, Vaz Gomes A, Jongasma PM, Riethorst A, Juretic D (1995)** Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *Eur J Biochem* 228:257-264.
384. **Weyand A (2005)** Evaluierung des Keimstatus im Ebersperma und Erstellung eines Hygienekonzeptes für Labore in Schweinebesamungsstationen. Tierärztliche Hochschule Hannover.
385. **Wheat PF, Winstanley TG, Spencer RC (1985)** Effect of temperature on antimicrobial susceptibilities of *Pseudomonas maltophilia*. *J Clin Pathol* 38:1055-1058.
386. **Wiedemann I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, de Kruijff B, Sahl HG (2001)** Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* 276:1772-1779.
387. **Wieprecht T, Dathe M, Beyermann M, Krause E, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M (1997)** Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry* 36:6124-6132.
388. **Wieprecht T, Dathe M, Epand RM, Beyermann M, Krause E, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M (1997)** Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry* 36:12869-12880.
389. **Wieprecht T, Dathe M, Krause E, Beyermann M, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M (1997)** Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS Lett* 417:135-140.
390. **Wieprecht T, Dathe M, Schumann M, Krause E, Beyermann M, Bienert M (1996)** Conformational and functional study of magainin 2 in model membrane environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement. *Biochemistry* 35:10844-10853.
391. **Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I (1998)** Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol* 142:473-484.

392. **Wojcik C, Sawicki W, Marianowski P, Benchaib M, Czyba JC, Guerin JF (2000)** Cyclodextrin enhances spermicidal effects of magainin-2-amide. *Contraception* 62:99-103.
393. **Wolff H, Panhans A, Stolz W, Meurer M (1993)** Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E coli*. *Fertil Steril* 60:154-158.
394. **Wu M, Hancock RE (1999)** Improved derivatives of bactenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1274-1276.
395. **Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE (1999)** Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38:7235-7242.
396. **Yan H, Hancock RE (2001)** Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1558-1560.
397. **Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ (2004)** Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 22:181-215.
398. **Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ (2000)** Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 68:9-14.
399. **Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ (1999)** Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525-528.
400. **Yang JY, Wang GX, Liu JL, Fan JJ, Cui S (2007)** Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol* 24:381-387.
401. **Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, Huang HW (2000)** Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J* 79:2002-2009.
402. **Yeagle PL (1985)** Cholesterol and the cell membrane. *Biochem Biophys Acta* 822:267-287.
403. **Yeaman MR, Yount NY (2003)** Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55:27-55.
404. **Yenugu S, Chintalgattu V, Wingard CJ, Radhakrishnan Y, French FS, Hall SH (2006)** Identification, cloning and functional characterization of novel beta-defensins in the rat (*Rattus norvegicus*). *Reprod Biol Endocrinol* 4:7.
405. **Yudin AI, Tollner TL, Li MW, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN (2003)** ESP13.2, a member of the beta-defensin family, is a *macaque* sperm surface-coating protein involved in the capacitation process. *Biol Reprod* 69:1118-1128.
406. **Zachowski A (1993)** Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 294:1-14.
407. **Zaiou M (2007)** Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med* 85:317-329.
408. **Zairi A, Belaid A, Gahbiche A, Hani K (2005)** Spermicidal activity of dermaseptins. *Contraception* 72:447-453.
409. **Zanich A, Pascall JC, Jones R (2003)** Secreted *epididymal* glycoprotein 2D6 that binds to the sperm's plasma membrane is a member of the beta-defensin superfamily of pore-forming glycopeptides. *Biol Reprod* 69:1831-1842.
410. **Zapico P, Medina M, Gaya P, Nunez M (1998)** Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Int J Food Microbiol* 40:35-42.
411. **Zasloff M (1987)** Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5449-5453.
412. **Zasloff M (2002)** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.
413. **Zasloff M, Martin B, Chen HC (1988)** Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:910-913.
414. **Zeuner A (1992)** On the relations between sperm morphology and the fertility of boar semen. *12th Int Congr Anim Reprod*:1617-1619.

415. **Zhang G, Ross CR, Blecha F (2000)** Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet Res* 31:277-296.
416. **Zhang L, Benz R, Hancock RE (1999)** Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. *Biochemistry* 38:8102-8111.
417. **Zhang L, Falla TJ (2004)** Cationic antimicrobial peptides - an update. *Expert Opin Investig Drugs* 13:97-106.
418. **Zhou CX, Zhang YL, Xiao L, Zheng M, Leung KM, Chan MY, Lo PS, Tsang LL, Wong HY, Ho LS, Chung YW, Chan HC (2004)** An *epididymis*-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol* 6:458-464.

9 Vorträge mit publizierten Kurzfassungen

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

M. Schulze, C. Junkes, S. Speck, J. Streich, M. Dathe, B. Stähr, K. Müller (2008):
The influence of synthetic antimicrobial peptides on the *in vitro* quality of liquid preserved boar spermatozoa. 41. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 33. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung 2008, Gießen.

S. Speck, M. Schulze, C. Junkes, B. Stähr, K. Müller, M. Dathe (2008):
The activity of synthetic antimicrobial peptides towards bacteria derived from liquid preserved boar semen. 41. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 33. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung 2008, Gießen.

M. Schulze, C. Junkes, S. Speck, J. Streich, M. Dathe, B. Stähr, K. Müller (2008):
The influence of synthetic antimicrobial peptides on the quality of liquid preserved boar spermatozoa. 3. Doktoranden-Symposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin 2008.

M. Schulze, A. Ligner, J. Böhm, A. Wehrend, J. Kauffold, B. Stähr, M. Wähner (2008):
Auswirkungen einer Zearalenonbelastung im geburtsnahen Zeitraum auf die Körperentwicklung und Fortpflanzungsfunktion von Ebern. 14. Mitteldeutscher Schweine-Workshop 2008, Bernburg.

M. Schulze, A. Ligner, J. Boehm, J. Kauffold, B. Staehr, M. Waehner, A. Wehrend (2009):
Effects of zearalenone during the perinatal period on pubertal development and boar reproductive potential. 42. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 34. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung 2009, Leipzig.

M. Schulze, S. Speck, C. Junkes, B. Staehr, R. Doelling, P. Mueller, M. Dathe, K. Mueller (2009):
Cyclic Antimicrobial Peptides – effects on boar sperm quality. 42. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 34. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung 2009, Leipzig.

C. Junkes, M. Schulze, S. Speck, S. Farnaud, R. Doelling, K. Mueller, M. Dathe (2009):
Cyclic antimicrobial peptides to conserve boar semen. Gordon Research Conference „Antimicrobial Peptides - Understanding Health And Disease Through Antimicrobial Host Defense Peptides“ 2009, Ventura (CA).

M. Schulze, K. Rüdiger, C. Junkes (2010):
Influence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on the *in vitro* quality of liquid-preserved boar spermatozoa. 43. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 35. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, München.

10 Danksagung

An dieser Stelle sei es mir gestattet, Frau Dr. Karin Müller, vormals IFN und jetzt am Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung tätig, herzlichst für das Vertrauen, die freundliche Überlassung der interessanten Thematik, die nette und ausgezeichnete Betreuung sowie die gründliche und engagierte wissenschaftliche Unterstützung meiner Arbeit zu danken. Ganz besonders möchte ich ihre richtungsweisenden Diskussionen und Anregungen sowie ihre Kreativität hervorheben.

Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Dr. Burghard Stähr. Ich bedanke mich besonders für die fachliche, organisatorische und freundschaftliche Unterstützung meiner Arbeit, die ruhige und besonnene Art, Probleme zu lösen, den reichhaltigen Erfahrungsschatz und die vielen lehrreichen Gespräche.

Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Stephanie Speck, die die mikrobiologische Aufsicht der Arbeit übernommen hat, für die tatkräftige Unterstützung und zuverlässige Hilfe bei der Auswertung sowie für die vielen Hinweise. Herrn Lars Konkel und Frau Nadine Jahn danke ich für die Bearbeitung der mikrobiologischen Proben.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. Margitta Dathe danken, ohne sie wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen. Vielen Dank für die fachlichen Hinweise, die vielen Anregungen und die gelungene Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Christof Junkes, meinem Freund und Weggefährten, für seine Hilfestellungen und die gemeinsamen Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Peter Müller bedanke ich mich für die Hilfestellung in der Elektronenspinresonanzspektroskopie, für die Bereitstellung der Phospholipide und für die gemeinsame Messung und Auswertung der Daten.

Herrn Professor Dr. Heribert Hofer danke ich besonders für die Unterstützung in der statistischen Auswertung der Arbeit und die Bereitstellung des von ihm erstellten Statistikprogramms „Friedman, Quade and Page tests“ (Version 2009). Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Jürgen Streich, insbesondere für die Unterstützung bei der statistischen Versuchsplanung.

Herrn Dr. Burkhard Wiesner und Frau Jenny Eichhorst danke ich für die gewährte fachliche Hilfestellung in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.

Der Biosyntan, insbesondere Herrn Dr. Rudolf Dölling, danke ich für die Synthese der Peptide.

Weiterhin danke ich Frau Karin Rüdiger und Frau Anita Retzlaff für die Einführung in die Handhabung von Eberspermien und für die Hilfe bei den Laborarbeiten, Herrn Lutz Rothe für die Behebung von technischen Problemen. Allen übrigen Mitarbeitern des IFN danke ich für das familiäre Arbeitsklima und die rege Anteilnahme am Entstehungsprozess der Arbeit.

Für die Gewinnung und Bereitstellung der Ejakulate danke ich Frau Irena Schmidt, Frau Heidrun Müller und Herrn Hauke Hönicke.

Der AIF danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich auch bei meiner Familie für die Geduld, die Anteilnahme und für die hervorragende Versorgung bedanken.

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Weder diese noch eine andere Arbeit wurde von mir an einer anderen Universität oder Hochschule zum Zwecke der Einleitung eines Promotionsverfahrens vorgelegt.

Schönow, den 15.03.2010

Martin Schulze