

Aus der
Tierklinik für Fortpflanzung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
(AG Prof Dr. Dr. habil. P.S. Glatzel)
in Zusammenarbeit mit
dem Institut für Pharmakologie des Fachbereiches Humanmedizin
der Freien Universität Berlin
(Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. G. Schultz)

**Die Rolle Pertussistoxin-sensitiver
G-Proteine bei der Auslösung der
Akrosomreaktion in Säugetierspermien**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Ulrich Severin
Tierarzt aus Berlin

Berlin 2002

Journal-Nr. 2609

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M.F.G. Schmidt
Erster Gutachter	Univ.-Prof. Dr. P.S. Glatzel
Zweiter Gutachter	Univ.-Prof. Dr. G. Schultz

Tag der Promotion: 28.06.2002

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literatur.....	2
2.1 Kapazitation	2
2.1.1 Physiologische Aspekte der Kapazitation	2
2.1.2 Biochemie der Kapazitation	4
2.2 Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion	6
2.2.1 Struktur und Funktion der Zona pellucida	6
2.2.2 Interaktion der Gameten	8
2.2.3 Akrosom und Akrosomreaktion	11
2.2.4 Rolle von G-Proteinen in der Zona pellucida-induzierten Akrosomreaktion	13
2.2.5 Biochemie der Akrosomreaktion	16
2.3 Andere Induktoren der Akrosomreaktion	19
2.3.1 Prostaglandine	19
2.3.2 Progesteron	20
2.3.3 Angiotensin Converting Enzyme / Angiotensin II	21
2.4 Pertussistoxin als zellbiologisches Werkzeug.....	22
3 Eigene Untersuchungen	24
3.1 Material und Methode	24
3.1.1 Hersteller und Lieferfirmen.....	24
3.1.2 Chemikalien und Zubehör.....	24
3.1.3 Lösungen, Puffer und Medien.....	26
3.1.4 Gewinnung und <i>in-vitro</i> Kapazitation der Spermien \pm PTX	28
3.1.4.1 Swim-up-Verfahren	28
3.1.4.2 Eberspermien.....	29
3.1.4.3 Bullenspermien	29
3.1.4.4 Mäusespermien	30
3.1.4.5 Humane Spermien	30
3.1.5 Gewinnung boviner und porciner Oocyten.....	31
3.1.6 Fluorometrische Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in Spermien	32
3.1.7 Fluorometrische Einzelzell-Bestimmung intrazellulärer Calciumkonzentrationen ($[Ca^{2+}]_i$)	32
3.1.8 Zona pellucida Bindungs-Assay (ZPBA)	33
3.1.9 Bestimmung des akrosomalen Status.....	34

3.1.9.1 Akrosomreaktion in Spermisuspensionen	35
3.1.9.2 Akrosomreaktion an intakten Zonae	36
3.1.9.2.1 Fixierung, Lyse und Färbung	36
3.1.9.2.2 Auswertung der FITC-PNA / EthD-1-Färbung.....	36
3.1.10 Pertussistoxin- katalysierte ³² P-ADP-Ribosylierung von	38
Spermienmembranen	38
3.1.10.1 Präparation von Spermienmembranen	38
3.1.10.2 Präaktivierung von PTX und ADP-Ribosylierung mit ³² P-NAD ⁺	39
3.1.10.3 SDS- Gelelektrophorese und autoradiographische Auswertung	40
3.1.12 Auswertung	40
4 Ergebnisse	41
4.1 Fluorimetrische Messung der [Ca ²⁺] _i in Eberspermien	41
4.2 Nachweis der Wirksamkeit des PTX im Kapazitationsmedium	43
4.3 Zona pellucida Bindungs-Assay.....	45
4.4 Mastoparan-induzierte Akrosomreaktion in Eberspermien	49
4.5 Modifizierter <i>Zona pellucida</i> Bindungs-Assay	50
4.6 PTX-vermittelte ADP- Ribosylierung	55
4.6.1 ADP-Ribosylierung an Eberspermienmembranen	55
4.6.2 ADP- Ribosylierung an HL-60-Membranen.....	57
4.6.3 Vergleichende ADP-Ribosylierung.....	58
5 Diskussion	60
6 Ausblick	70
7 Zusammenfassung	73
8 Summary	75
9 Literaturverzeichnis.....	77

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BTS	Beltsville Thawing Solution
BWW	Biggers-Whitten and Whittingham
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
DAG	Diacylglycerol
DEL	Deutsche Veredelte Landrasse
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Deutsche Schwarzbunte
DTT	Dithiotreitol
EthD-1	Ethidium Homodimer 1
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
F	Fluoreszenz
FCS	Fötale Kälberserum
FITC-PNA	Erdnussagglutinin-gekoppeltes Fluoreszein-Isothiocyanat
FITC-PSA	<i>Pisum sativum</i> -Agglutinin-gekoppeltes Fluoreszein-Isothiocyanat
F _{min}	minimale Fluoreszenz
F _{max}	maximale Fluoreszenz
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HDL	High density lipoprotein
HEPES	N-2-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
IAM	Innere akrosomale Membran
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
mRNA	Botenribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
mV	Millivolt
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
OAM	outer acrosomal membrane
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PSL	Photonen-stimulierte Lumineszenz
PTX	Pertussistoxin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat)
SEM	standard error of mean
SZK	Spermien-Zona-Komplexe
TALP	Tyrode's Albumine Lactate Pyruvate
ZP	Zona pellucida
ZP1	<i>Zona pellucida</i> Glycoprotein 1
ZP2	<i>Zona pellucida</i> Glycoprotein 2
ZP3	<i>Zona pellucida</i> Glycoprotein 3
ZPBA	<i>Zona pellucida</i> Bindungs Assay
ZRK	Zona Rezeptor Kinase

7 Zusammenfassung

Seit langem wird die Beteiligung von G-Proteinen der G_i -Familie an der Signaltransduktion der AR diskutiert, wobei die dazu durchgeführten Untersuchungen mit Pertussistoxin (PTX) als zellbiologischem Werkzeug durchgeführt wurden. Die Effizienz der PTX-Behandlung von Spermatozoen verschiedener Spezies wurde allerdings nie systematisch überprüft. Die vorliegende Arbeit hatte deshalb das Ziel, anhand funktioneller und biochemischer Testverfahren systematisch den Einfluss von PTX auf die an der AR beteiligten G-Proteine zu untersuchen, um die katalytische Wirkung des Toxins von einem unspezifischen Effekt auf Säugetierspermatozoen abzugrenzen.

Als zentrales, die AR auslösendes Ereignis, wird der Ca^{2+} -Einstrom nach Bindung an die ZP angenommen. Mit Hilfe der fluorimetrischen $[Ca^{2+}]_i$ -Bestimmungen konnte in Eberspermien gezeigt werden, dass der durch den G_i -Protein-Aktivator Mastoparan-induzierte Ca^{2+} -Influx PTX-insensitiv ist. PTX-vorbehandelte Eberspermien reagierten ebenso wie die Spermien aus der Solvenskontrolle mit einem schnellen, langanhaltenden Einstrom von Ca^{2+} -Ionen auf nahezu identische Plateaus. Während der sechsstündigen Kapazitation kommt es nicht zur Inaktivierung des Toxins, wie die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung von Chemokin-stimulierten Ca^{2+} -Transienten in Co-inkubierten HL-60-Zellen zeigen konnte. Ein unspezifischer Effekt von PTX auf Spermatozoen, der die funktionelle Integrität der Zellen beeinträchtigt, konnte anhand des Zona pellucida-Bindungs-Assays ausgeschlossen werden. In Gegenwart von PTX kapazitierte Eber- und Bullenspermien banden mit vergleichbarer Effizienz an homologe *Zonae* wie die Solvens-behandelten Kontrollen. Da nur kapazitierte Spermien an die *Zona pellucida* binden können, lässt sich mit diesem Testverfahren die Kapazitation als funktioneller Parameter erfassen.

Im Zusammenhang mit der PTX-Insensitivität des Mastoparan-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms wurden die Auswirkungen der PTX-Vorbehandlung auf die Mastoparan-induzierte Akrosomreaktion an Eberspermien untersucht. Mastoparan löst in PTX – behandelten kapazitierten Eberspermien eine AR mit nahezu identischer Effizienz aus wie in Kontrollpermien. Um festzustellen, welche Auswirkung PTX auf die Zona pellucida-induzierte AR kapazitierter Spermatozoen hat, wurde durch Doppelfärbung mit PNA-gekoppeltem FITC und Ethidium-Homodimer1 der akrosomale Status Zona-gebundener Eberspermien bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zona

pellucida-induzierte AR nicht durch PTX-Vorbehandlung hemmbar ist. Aus diesen Befunden ergab sich der Verdacht, dass PTX nicht in der Lage ist, während der Kapazitation in intakte Säugetierspermatozoen zu gelangen und dort G_i-Proteine zu ADP-ribosylieren. Daher wurden zunächst die Expressionsniveaus von G_i-Proteinen in Membranen von humanen, porcinen, murinen, und bovinen Spermien durch metabolische Markierung mit ³²P-NAD⁺ als Substrat für PTX erfasst. Es konnte mit Ausnahme des Rindes in den Membranen aller untersuchter Spezies die Expression von G_i-Proteinen bestätigt werden. Durch Vorbehandlung der Spermien mit oder ohne PTX, nachfolgende Membranpräparation und metabolischer Markierung konnte die Vermutung bestätigt werden, dass PTX während der Kapazitation nicht in der Lage war, G_i-Proteine zu ADP-ribosylieren und sie somit funktionell zu entkoppeln.

Somit konnte festgestellt werden, dass die PTX-Behandlung von Spermien unterschiedlicher Spezies nicht in der Lage ist, eine funktionelle Entkopplung zu erzielen. Vermutlich ist das Toxin nicht in der Lage, die intakte Plasmamembran zu überwinden, und ist daher nicht geeignet, als zellbiologisches Werkzeug die Beteiligung von G_i-Proteinen an der *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion nachzuweisen.

Unter mehreren charakterisierten ZP3-Rezeptoren soll die β-1,4-Galactosyltransferase G_i-Proteine aktivieren und dadurch zur Auslösung der AR beitragen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen allerdings Zweifel daran aufkommen, ob die ZP3-vermittelte AR über G-Proteine das einzig annehmbare Modell sein kann. Vielmehr gewinnen durch die hier vorgestellten Befunde G-Protein-unabhängige Konzepte wie etwa eine p95 Tyrosinkinase oder Ca²⁺-permeable Ionenkanäle wie PKDREJ und PKD2L sowie PKD2L2 neue Bedeutung als Kandidaten für die durch *Zona pellucida*-Glykoproteine ausgelösten Signalmechanismen.

8 Summary

The role of pertussis-toxin-sensitive G-proteins in the induction of the acrosome reaction in mammalian spermatozoa

The participation of G-proteins belonging to the G_i-family in the induction of the acrosome reaction has been discussed for a long time using pertussis toxin (PTX) as a cell biological tool for the investigations carried out for this purpose. The efficiency of a PTX-treatment on spermatozoa of different species has never been verified. The aim of this work was to examine systematically the influence of PTX on G-proteins involved in the acrosome reaction (AR), employing functional and biochemical assays to differentiate the toxin's catalytic properties from a non-specific action on mammalian spermatozoa.

An influx of Ca²⁺ following the attachment of sperm to the ZP is supposed to be a major event in fertilization, triggering the acrosome reaction. Fluorimetric determination of [Ca²⁺]_i in boar sperm showed no PTX-sensitivity for the influx of Ca²⁺ induced by the G_i-protein activator mastoparan. Boar spermatozoa that had undergone PTX-treatment prior to determination of [Ca²⁺]_i as well as those of the solvent control reacted with a quick, long lasting influx of Ca²⁺ up to nearly identical plateaus. PTX is not inactivated during the six-hour capacitation as shown by fluorescence microscopic assessment of chemokine-stimulated Ca²⁺-transients in co-incubated HL-60 cells. A non-specific effect of PTX on spermatozoa affecting the cell's functional integrity was excluded as shown by the results of the *zona pellucida*-binding assay. Bull and boar spermatozoa capacitated in the presence of PTX attached to homologous *zonae* with comparable efficiency as did solvent-pretreated sperm. Because only fully capacitated spermatozoa can bind to the *zona pellucida*, this assay allows to assess capacitation as a functional parameter.

In connexion with the PTX-insensitivity of the mastoparan-induced Ca²⁺-influx, the effect of PTX pre-treatment on the mastoparan-induced acrosome reaction of boar sperm was investigated. Mastoparan induced the acrosome reaction to comparable extent in PTX pre-treated and non pre-treated boar spermatozoa. In order to investigate the influence of PTX on the *zona pellucida*-stimulated AR, the acrosomal status of *zona*-bound boar sperm was determined using a FITC-PNA/Ethidium-homodimer-1 double stain. It could be evidenced that the *zona pellucida*-induced AR was not abolished by PTX pre-treatment. These findings implicated PTX might not be

able to cross the plasma membrane of intact mammalian spermatozoa during capacitation and thus is unable to carry out ADP-ribosylation of G_i-proteins. For this reason, expression rates of G_i-proteins in membranes of human, porcine, murine and bovine sperm were examined by metabolic marking with ³²P-NAD⁺ as a substrate for PTX. Expression of G_i-proteins was clearly confirmed in any of the species tested except for bovine spermatozoa. Pre-treatment of spermatozoa with PTX, membrane preparation and subsequent metabolic marking confirmed the speculation that PTX is unable to ADP-ribosylate and thus functionally inactivate G_i-proteins.

It could be established that PTX-treatment of spermatozoa from different species does not result in a functional uncoupling. The toxin probably cannot cross the intact plasma membrane and thus is not suitable to function as a cell biological tool to investigate the role of G_i-proteins in the *zona pellucida*-induced acrosome reaction.

Within a group of several ZP3 receptor candidates, β-1,4-galactosyltransferase is supposed to be involved in the activation of G_i-proteins and the induction of the acrosome reaction. Given the results of the present study, it is doubtful whether the ZP3-mediated AR via G-proteins represents the only acceptable signal transduction pathway. The data presented in this study give new significance to other G-protein-independent concepts such as a p95 tyrosinkinase or Ca²⁺-permeable ion channels as candidates for signal transduction mechanisms induced by *zona pellucida* glycoproteins.

Publikationen

GILLES M, SEVERIN U, GLATZEL PS (1999) The *zona pellucida* binding assay(ZPBA) as a tool for the evaluation of a successful *in vitro* fertilization(IVF).

Poster 32. Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Hannover 18.-19. Februar 1999.

Abstract in: Reproduction in domestic animals 34: 33

SEVERIN U, SCHAEFER M, GILLES M, GUDERMANN T, GLATZEL PS, SCHULTZ G (2000): Effects of pertussistoxin (PTX) on G-proteins in intact mammalian spermatozoa.

Poster 33. Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Berlin 17.-18. Februar 2000.

Abstract in: Reproduction in domestic animals 35: 39-40

GILLES M, ALI A, SEVERIN U, LANGE A, GLATZEL PS (2000): Influence of heparin-induced capacitation on the *zona*-binding (SZP_B) of cryopreserved bull spermatozoa *in vitro*.

Vortrag 33. Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung,

Berlin 17.-18. Februar 2000.

Abstract in: Reproduction in domestic animals 35: 12

GILLES M, SEVERIN U, SCHAEFER M, GLATZEL PS (2001): Biotesting of spermatozoa for the use in *in vitro*-systems.

Arch Tierz Dummerstorf 44: 118-120

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. habil P.S. Glatzel und Herrn Prof. Dr. med. G. Schultz sei herzlich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit gedankt.

Meinen Eltern, die mir die Ausbildung ermöglicht haben, danke ich von Herzen für ihre immerwährende Unterstützung.

Sandra, danke für Deine Geduld, mit der Du mich immer wieder motiviert und mir die einfache Lösung quantitativer Probleme nahegebracht hast. Ohne Dich hätte es noch länger gedauert!

Mein besonderer gilt Herrn Dr. med. Michael Schaefer für seine Mühe bei der wissenschaftlichen Beratung, das Korrekturlesen des Manuskripts und seine stets konstruktive Kritik.

Danke auch an Herrn Markus Gilles, der mir den Umgang mit sensiblen Spermien, widerspenstigen Eizellen sowie springenden Bullen beigebracht hat.

Frau Nadine Albrecht –Institut für Pharmakologie- und Frau Renate Prédhumeau – Tierklinik für Fortpflanzung- danke ich für die Einarbeitung ins Laborleben. Auch allen anderen Mitarbeitern der Tierklinik für Fortpflanzung gilt mein herzlicher Dank, insbesondere den Herren Tierpflegern Schimmel und Banja.

Vielen Dank Julia für zahlreiche treffliche Laboranalysen, die manch ein Ärgernis in lautes Gelächter verwandelten.

Herrn Dr. Josef Bergmann danke ich für „Ovokollekt“ und zahlreiche, das nächtliche Eiersammeln aufheiternde Zitate eines der bedeutendsten Lyriker und Volksschauspieler unserer Zeit.

Den Bullen „Lipic“ und „Altanus“ bin ich zu Dank für ihre Mitarbeit und ihre Materialspende verpflichtet. Eber „Marco“ danke ich für seine unermüdliche Bereitschaft, sich in aller Frühe auf das Phantom zu schwingen.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen am Schlachthof des Fleischzentrum Lausitz GmbH in Kasel-Golzig gilt mein Dank für die Hilfe bei der Beschaffung der Ovarien und die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Name	Ulrich Severin
Geboren	08.12.1969 in Berlin
Familienstand	verheiratet
Schulbildung	1976 bis 1980 Grundschule Quickborn-Heide 1980 bis 1989 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Quickborn Abitur 1989
Wehrdienst	1989 bis 1990 bei Sanitätsbataillon 6 Itzehoe
Studium	WS 1990/91 bis SS 1997 an der Freien Universität Berlin
Approbation	September 1997
Promotion	Ab September 1998 Doktorand an der Tierklinik für Fortpflanzung der FU-Berlin bei Prof. Dr. Dr. habil P.S. Glatzel in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie des Fachbereiches Humanmedizin der FU-Berlin, geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. G. Schultz. Von August 1999 bis Mai 2000 gefördert durch NaFöG-Stipendium.
Auslandsaufenthalte	WS 1994/95 bis SS 1995 als ERASMUS-Stipendiat an der Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Frankreich September bis November 1996 Bureau Vétérinaire de Richmond, Richmond, Québec, Canada ; gefördert durch den DAAD.
Berufstätigkeit	Mai 1998 bis April 2000 Hospitanz in einer tierärztlichen Praxis für Pferde. Mai 2000 bis März 2001 Assistenz in einer tierärztlichen Klinik für kleine Haustiere. Seit April 2001 Assistent in einer tierärztlichen Gemischtpraxis mit Schwerpunkt Kleintier.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist, insbesondere, dass ich alle Textstellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen sind, kenntlich gemacht habe.

Berlin 28.06.2002

Ulrich Severin