

### 3 Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Material und Methode

##### 3.1.1 Hersteller und Lieferfirmen

- (1) Amersham Buchler, Braunschweig
- (2) Boehringer, Mannheim
- (3) Calbiochem, Bad Soden
- (4) Gibco, Eggenstein
- (5) Merck, Darmstadt
- (6) Molecular Probes, Leiden, NL
- (7) NEN Life Technologies
- (8) Serva, Heidelberg
- (9) Sigma, Deisenhofen

##### 3.1.2 Chemikalien und Zubehör

Acrylamid	(8)
Adenosintriphosphat (ATP)	(9)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	(5)
Bis-Benzimid	(9)
Calciumchlorid	(8)
Citratpuffer	(9)
Dichlordimethylsilan	(9)
Dinatriumhydrogenphosphat	(8)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(9)
Dithiothreitol (DTT)	(9)
EGTA	(5)
Ethidium-Homodimer-1	(6)
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	(9)
FITC-PNA	(9)
FITC-PSA	(9)
Fluo-3/AM	(6)
Fötale Kälberserum (FCS)	(2)

---

Fura-2/AM	(4)
Glutaraldehyd	(9)
Glycin	(8)
N-2-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-N´-2-ethanolsulfonsäure (HEPES)	(8)
Hybond C <sup>+</sup> -Membran	(1)
Ionomycin	(9)
Heparin	(9)
Kaliumchlorid	(8)
Lubrol- PX	(9)
Magnesiumchlorid	(8)
Mastoparan	(3)
2-Mercaptoethanol	(9)
Mineralöl	(9)
<sup>32</sup> P-NAD	(7)
Natriumchlorid	(8)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(9)
Nonidet P- 40 (NP- 40)	(8)
Paraformaldehyd	(9)
Pertussistoxin	(3)
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	(8)
Poly-L-Lysin	(8)
Proteinmarker (vorgefertigt für SDS- PAGE)	(4)
Tetramethylethylendiamid (TEMED)	(9)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	(9)
Triton X-100	(9)

### 3.1.3 Lösungen, Puffer und Medien

#### Kapazitationsmedien

##### 1. Modifiziertes Tyrode- Medium (TALP)

CaCl <sub>2</sub>	2,0 mM
KCl	3,1 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,4 mM
NaCl	100 mM
NaHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 mM
Na- Pyruvat	1,0 mM
Na- Lactat	21,6 mM
HEPES	10,0 mM
FCS	20 % (v/v)

pH 7,4 ; 300 mosmol/l

##### 2. Biggers- Whitten und Whittingham Medium (BWW)

CaCl <sub>2</sub>	1,3 mM
Glucose	5,5 mM
HEPES	20 mM
KCl	5,0 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
NaCl	166 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Na-Lactat	21 mM
Na-Pyruvat	0,25 mM
FCS	20 % (v/v)

pH 7,4 ; 410 mosmol/l

3. Beltsville Thawing Solution (BTS)

EDTA	3,36 mM
Glucose	0,2 M
KCl	10 mM
Na-Citrat	20 mM
NaHCO <sub>3</sub>	15 mM
Penicillin-G Natrium	0,6 g / l
Dihydrostreptomycin	1,0 g / l

Präparationspuffer für Spermien- Plasmamembranen (Althouse et al. 1995)

Aminobenzamidin	5 mM
HEPES	5 mM
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
NaCl	0,137 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM

pH 7,5 / pH 5

PTX-Rekonstitutionspuffer für lyophilisiertes PTX

Harnstoff	2 M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM

pH 7,0

Aktivierungspuffer für PTX

ATP	10 mM
DTT	40 mM
PTX	1 µg/µl

Puffer für aktiviertes PTX

DTT	20 mM
EDTA, pH 7,5	1 mM
FCS	0,1%
TRIS, pH 7,5	24,8 mM

Reaktionspuffer für PTX- vermittelte ADP- Ribosylierung

ATP	10,0 mM
EDTA	2,0 mM
GTP	2,0 mM
Lubrol-PX	0,6%
<sup>32</sup> P-NAD	5 mCi/ml (800 Ci/mmol spezifische Aktivität)
Thymidine	20 mM
TRIS-HCl, pH 7,5	167 mM

**3.1.4 Gewinnung und *in-vitro* Kapazitation der Spermien ± PTX**

Als Spendertiere standen ein DEL-Eber, ein Fleckviehbulle, ein DSB-Bulle, ein brauner Milchschaaf-Bock, ein bunter deutscher Edelziegenbock und Labormäuse zur Verfügung. Humane Ejakulate stammten aus dem Probandenpool der Firma Schering AG, Berlin.

Es kamen nur Ejakulate mit speziesspezifisch normalen spermatologischen Parametern zur Anwendung, wobei sich die spermatologische Untersuchung auf Dichtebestimmung, Massen- und Einzelbewegung sowie die Lebend-Tot-Färbung beschränkte.

**3.1.4.1 Swim-up-Verfahren**

Zur Trennung der Spermatozoen vom Seminalplasma wurde bei bovinen und humanen Ejakulaten das *swim-up*-Verfahren angewandt. Dies ist ein sehr schonendes Trennverfahren, da es keiner Zentrifugation bedarf (LOPATA et al. 1976). Mittels einer Insulinspritze werden in einem Reagenzgefäß 0,25 ml humanes

resp. 0,5 ml bovines Ejakulat unter 2 ml des entsprechenden Kapazitationsmediums gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre wird der Überstand mit den aufgeschwommenen Spermien abgenommen und kann in den weiteren Versuchsablauf eingehen.

#### 3.1.4.2 Eberspermien

Die Gewinnung von Ebersperma wurde durch manuelle Stimulation des auf ein Phantom aufgesprungenen Ebers und Auffangen des Ejakulats in einem 500 ml Kunststoffmessbecher durchgeführt. Es folgte die Filtration durch einen Gazefilter in ein weiteres 500 ml Kunststoffgefäß. Ein Milliliter originäres Ejakulat wurde zur spermatologischen Untersuchung eingesetzt. Zum Einsatz kamen nur Ejakulate, deren Spermien eine Vorwärtsbeweglichkeit von mindestens 70 % aufwiesen und deren Höchstgehalt an toten Spermien 20 % nicht überstieg.

Die Ejakulate wurden mit BTS im Verhältnis 1:5 verdünnt. 10 ml verdünnten Ejakulates wurden dreimal für 8 Minuten bei 600 x g in PBS gewaschen. Es folgte die Resuspendierung der Spermien in TALP, wobei die Dichte mit Hilfe des Hämozytometers nach Thoma auf  $30 \times 10^6$  Spermien/ml eingestellt wurde. Je 2 ml der Spermiesuspension wurden in ein 5 ml Kunststoff-Probenröhrchen überführt, mit 1 µg/ml PTX oder dem PTX-Rekonstitutionspuffer versetzt und für 6 Stunden bei 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C kapazitiert. Die Proben wurden während der Kapazitation im Abstand von zwei Stunden aufgeschüttelt, und nach sechs Stunden erfolgte die Kontrolle der Motilität der Spermien im Überstand. Es wurden für alle Versuche nur solche Proben verwendet, in denen die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien nach Abschluß der *in-vitro* Kapazitation noch mindestens 50 % betrug.

#### 3.1.4.3 Bullenspermien

Bullensperma wurde durch Absamen der Bullen mit der künstlichen Scheide (Modell Hannover) gewonnen, wobei als Sprungpartnerinnen verschiedene klinikeigene Kühe dienten. Jede Samengewinnung erfolgte im Doppelsprung, d.h. jeder Bulle wurde zweimal im Abstand von etwa fünf Minuten zur Samengewinnung herangezogen. Ein Milliliter nativen Ejakulats gelangte zur spermatologischen Untersuchung, der Rest wurde bei 37°C warmgehalten. Zum Einsatz in den Versuchen kamen nur Ejakulate mit unauffälligen spermatologischen Parametern sowie einer Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien von mehr als 80%.

Die Ejakulate wurden dreimal in TALP gewaschen (600 x g; 8 min) und anschließend für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> dem swim-up-Verfahren unterzogen. Nach Abschluß des swim-up wurde der Überstand abgenommen und bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem TALP-Medium resuspendiert und die Dichte den jeweiligen Versuchsbedürfnissen angepasst (siehe dort). Zur *in-vitro* Kapazitation wurde je ein Milliliter Spermien suspension mit 10 µg / ml Heparin und 1 µg/ml PTX bzw. Rekonstitutionspuffer versetzt und die Spermien bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95% für sechs Stunden inkubiert. In die Versuche gelangten nur Spermienpopulationen, die nach Abschluß der Kapazitation eine Vorwärtsbeweglichkeit von mindestens 50% aufwiesen.

#### 3.1.4.4 Mäusespermien

Die Gewinnung von Mäusespermien geschah durch Präparation der Nebenhoden von zuvor getöteten Labormäusen. Dazu wurden die Nebenhoden in Petrischalen verbracht, in die zuvor 37°C warmes TALP-Medium vorgelegt worden war. Unter Zuhilfenahme zweier steriler Skalpellklingen wurden die Nebenhoden zerteilt, um die gespeicherten Spermien freizusetzen. Die gesamte Suspension wurde nachfolgend bei 37°C 30 min stengelassen, um größere Gewebstrümmer und schwere zelluläre Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde für 5 Minuten bei 600 x g zentrifugiert und das Pellet in 1 ml TALP resuspendiert. Es folgte die Beurteilung der Dichte und der Motilität der Mäusespermien, wobei nur solche Spermien suspensionen in die Versuche gelangten, bei denen mehr als 60 % der Spermien motil waren. Es wurden zwei Teile der Suspension zu je 500 µl in jeweils ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl TALP auf 1 ml aufgefüllt. Die Spermien wurden nachfolgend mit 1 µg/ml PTX bzw. Solvens versetzt und zur *in-vitro* Kapazitation für 6 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

#### 3.1.4.5 Humane Spermien

Die Ejakulatproben wurden durch Masturbation in ein steriles Gefäß gewonnen. Mittels einer langen Kanüle wurden 0,25 ml natives Ejakulat nach einer Verflüssigungszeit von 15-60 Minuten vorsichtig unter 2 ml BWW-Medium mit 20 % FCS gebracht und der swim-up Prozedur unterzogen. Nach 60 Minuten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit wurde der Überstand mit den aufgeschwommenen Spermatozoen vorsichtig abpipettiert, 10 Minuten bei 600 x g

gewaschen und danach mit frischem BWW- Medium auf eine Dichte von  $20 \times 10^6$  Spermien/ml eingestellt. Zur Kapazitation gelangten nur Proben, die nach dem *swim-up* mindestens 90% motile Spermien enthielten. Hierzu wurden die Spermiesuspensionen in zwei Aliquots zu je 1 ml aufgeteilt, denen 1 µg/ml PTX bzw. Rekonstitutionspuffer zugesetzt wurde. Anschließend wurden die Proben für 6 Stunden in den Brutschrank gestellt, wobei die Temperatur 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> und 95% iger Luftfeuchtigkeit betrug.

### 3.1.5 Gewinnung boviner und porciner Oocyten

Rinder- und Schweineovarien wurden von Schlachttieren am Schlachthof des Fleischzentrum Lausitz GmbH in Kasel-Golzig gewonnen und innerhalb von zwei Stunden nach dem Entfernen aus dem Tierkörper bei 4°C zur weiteren Aufarbeitung in Thermosgefäßen ins Labor gebracht.

Die Gewinnung der Oocyten erfolgte wie von GILLES et al. (1999a) beschrieben durch subkortikale Punktion der Ovarien mit einer sterilen Kanüle, wobei der Follikelinhalt mit einer Spritze (2 ml) aspiriert wurde. Die Punktate wurden in 5 ml PBS gepoolt und 30 min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment anschließend mit PBS in Petrischalen verdünnt. Es folgte das Aufsuchen der Cumulus-Oocyten-Komplexe (COK) unter dem Stereomikroskop unter 25-facher Vergrößerung. Die COK wurden mit Hilfe einer auf eine Insulinspritze aufgesetzten Unopette aufgenommen und in 3%iger Na-Citrat-Lösung in einem Erlenmeyerkolben gepoolt. Um die COK zu denudieren, wurden die gepoolten COK unter ständigem leichten Schwenken 60-90 Minuten inkubiert. Nach der Entfernung der Cumuluszellen wurden die denudierten Oocyten mittels Stereomikroskop aufgesucht und aliquotiert zu je 10 Stück in PBS bei -20°C bis zum Einsatz eingefroren.

### 3.1.6 Fluorimetrische Bestimmung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in Spermien

Für die Untersuchung der Wirkung von PTX auf den Mastoparan-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx wurden Eberspermien zunächst wie unter 3.1.4.2 beschrieben mit oder ohne 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PTX kapazitiert. Zur Bestimmung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Spermiesuspensionen wurde je 1 ml der Suspension während der letzten 30 min der Kapazitation mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-3/AM (4  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes) versetzt. Die Spermien wurden anschließend bei 600 x g für 8 min gewaschen, in TALP resuspendiert und zu einem beliebigen Zeitpunkt mit Mastoparan in einer Konzentration von 20-50  $\mu\text{M}$  stimuliert. Der Fluoreszenzindikator wurde vor und nach Stimulation in einem auf 37°C vorgewärmten Fluoreszenzspektrophotometer (LS50B, Perkin-Elmer) bei einer Wellenlänge von 506 nm angeregt und die Emission bei 526 nm aufgezeichnet. Zur Kalibration der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde 0,1% Triton X-100 (reduzierte Form) zur Bestimmung von  $F_{\text{max}}$  und EGTA (20 mM) zur Bestimmung des  $F_{\text{min}}$  zugesetzt. Für die anschließende Berechnung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde für Fluo-3 eine  $K_d$  von 400 nM angenommen und folgende Formel angewendet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{F - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F} \times K_d$$

### 3.1.7 Fluorimetrische Einzelzell-Bestimmung intrazellulärer Calciumkonzentrationen ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )

Um eine Inaktivierung des PTX während der Kapazitation auszuschließen, wurden Eberspermien (20 x 10<sup>6</sup> / ml) gemeinsam mit differenzierten HL-60-Zellen (1,5 x 10<sup>6</sup> / ml) für 6 Stunden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in TALP-Medium mit oder ohne 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PTX inkubiert. Während der letzten 30 min der Kapazitation wurden die Zellen mit Fura-2AM (4  $\mu\text{M}$ ) geladen. Nach Zentrifugation der Proben bei 600 x g für 5 Minuten wurden die Pellets in frischem, auf 37 ° C temperierten TALP- Medium resuspendiert.

Ein Tropfen Suspension wurde auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger verbracht, der danach zweimal mit Kapazitationsmedium gespült wurde. Die

Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  in den mit resp. ohne PTX inkubierten HL-60-Zellen erfolgte als Einzelzellmessung mit Hilfe eines digitalen Fluoreszenz-Imaging Systems (TILL Photonics, Martinsried, Deutschland), gekoppelt an ein Inversmikroskop (Zeiss Axiovert 100). Die Fluoreszenz von Fura-2 wurde abwechselnd bei 340 und 380 nm angeregt und während der Stimulation der HL-60-Zellen mit fMLP aufgezeichnet.

### 3.1.8 Zona pellucida Bindungs Assay (ZPBA)

Um festzustellen, ob PTX einen Einfluß auf die Funktionalität von Spermien hat, wurde als Parameter für die funktionelle Integrität die Kapazitation gewählt, die sich mit Hilfe eines Zona Bindungs Assays erfassen lässt. Dieser Test wurde, wie von GILLES et al (1999b, 2001) beschrieben, am bovinen und porcinen Modell durchgeführt.

*In-vitro* mit oder ohne 1 µg / ml PTX kapazitierte Bullen- resp. Eberspermien wurden nach Abschluß der sechsständigen Kapazitation hinsichtlich ihrer Motilität beurteilt. Dabei fanden nur solche Spermien suspensionen Verwendung, bei denen die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermatozoen mindestens 50 % betrug, um für die anschließende Co-Inkubation mit den ZP identische Ausgangsbedingungen an den Versuchstagen zu schaffen.

Die Spermien wurden für 8 min bei 600 x g zentrifugiert und das Pellet in frischem TALP resuspendiert, so dass die Dichte  $15 \times 10^6$  Spermien/ml betrug.

Während der letzten 60 min der Kapazitation wurden Rinder- bzw. Schweine ZP aufgetaut, unter dem Stereomikroskop aufgesucht und dann mit einer Unopette aus dem Lagermedium entnommen. Es folgte dreimaliges Waschen durch vorsichtiges Aspirieren und Ausspülen in frischem TALP-Medium. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden je 10 ZP in je eine Vertiefung einer 6-Loch Kunststoffplatte mit umgesetzt. Die ZP wurden mit 50 µl TALP überschichtet und zugedeckt 15 min bei 37°C vorgewärmt, damit bei der Zugabe der Spermien identische Temperaturverhältnisse herrschten.

Zu je einer Gruppe von 10 ZP wurden je 1 ml PTX-vorbehandelter bzw. unvorbehandelter Spermien hinzupipettiert. Die Co-Inkubation erfolgte anschließend für 90 min bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit.

Nach Abschluss der Co-Inkubation wurden die Spermien-ZP Komplexe (SZK) im Stereomikroskop aufgesucht und mit einer Unopette in 200  $\mu$ l PBS umgesetzt. Anschließend wurden die Komplexe mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette, deren Durchmesser etwa dem der ZP entsprach, dreimal durch mechanisches stripping in PBS gewaschen. Hierbei wurden die Komplexe über ein Mundstück in die Pipette hineingesogen und wieder ausgespült, wobei sich die nur lose anheftenden Spermien ablösten. Es folgte das Aufbringen der SZK auf Silan-beschichtete Multiwell-Objekträger und ihre sofortige Fixierung in 10  $\mu$ l eiskaltem Ethanol (70 %). Nach trocknen bei Raumtemperatur wurden die ZP unter mikroskopischer Kontrolle (200-fache Vergrößerung) in 10  $\mu$ l Citratpuffer (pH 2) aufgelöst. Die Köpfe der dabei aus der lysierten ZP freigesetzten Spermatozoen wurden anschließend mit dem DNA-Farbstoff bis-Benzimid (2  $\mu$ M in Aqua bidest) gefärbt (GILLES et al. 1999a). Die Auswertung des ZPBA erfolgte bei 400-facher Vergrößerung (Ölimmersion) im Epifluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 352 nm für bis-Benzimid. Dabei wurden die grün fluoreszierenden Köpfe der Spermien ausgezählt und die Anzahl gebundener Spermien +PTX mit der Anzahl gebundener Spermien, die nur mit dem PTX-Solvens vorbehandelt waren, verglichen. Hierfür wurde an jedem Versuchstag der Mittelwert  $\pm$  SEM der Bindungsraten der jeweiligen Versuchsgruppe berechnet, derjenige der solvens-behandelten Spermien auf 100%  $\pm$  SEM normiert und der Mittelwert  $\pm$  SEM der PTX-vorbehandelten Spermatozoen damit verglichen.

### **3.1.9 Bestimmung des akrosomalen Status**

Um den Einfluß von PTX auf die unspezifische und die Agonist-induzierte Akrosomreaktion zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden angewandt. Allen Versuchsansätzen war gemein, festzustellen, ob sich die Akrosomreaktionsrate PTX-vorbehandelter Spermien in einer Weise von der nicht PTX- vorbehandelter Spermien unterschied, dass sich daraus eine Hemmung der an der AR beteiligten G $\beta$ -Proteine ableiten ließ.

### 3.1.9.1 Akrosomreaktion in Spermisuspensionen

Eberspermien wurden nach der oben beschriebenen Methode in Gegenwart von 1 µg/ml PTX bzw. dem Solvens *in-vitro* kapazitiert. Nach Abschluß der Kapazitation wurden die Spermien einmal bei 600 x g für 8 Minuten zentrifugiert, das Pellet nachfolgend in TALP-Medium resuspendiert und die Dichte der Spermisuspension auf ca.  $8 \times 10^6$  Spermien/ml eingestellt. Zur Auslösung der AR wurden je 90 µl Suspension mit Mastoparan 50 µM in einem Eppendorfreaktionsgefäß versetzt und 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Proben wurden nachfolgend mit PBS gewaschen (600 x g, 5 min), das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und anschließend mit 900 µl Ethanol (70 %, eiskalt) für 20 min auf Eis fixiert. Es folgte das Zentrifugieren der Proben für eine Minute bei 13000 rpm und das Resuspendieren der Spermienpellets in 50 µl PBS. Je 5 µl Spermisuspension wurden in Vertiefungen eines „multiwell“-Objektträgers pipettiert und mindestens 30 min luftgetrocknet. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurden die Objektträger mit 1 ml 20% FCS in PBS überschichtet. Nach 10 min wurde das FCS durch Abklopfen entfernt. Zum Färben der Spermien wurde in jede Vertiefung 10 µl FITC-PSA (10 µg/ml) gegeben, die Objektträger in eine feuchte Kammer verbracht und dort bei 4°C für 30 min inkubiert. Im Anschluß an die Färbung wurden die Objektträger mehrfach in PBS gewaschen, abschließend mit Aqua bidest gespült und dann bei 35 C getrocknet. Um Basalwerte für die AR nach Abschluß der *in-vitro* Kapazitation zu erhalten, wurden zusätzlich Proben ± PTX, aber ohne Mastoparan behandelt. Alle Färbevorgänge fanden im Dunkeln statt.

Da Mastoparan in DMSO gelöst war, wurden jeder Kontrollsuspension für die Dauer der Stimulation entsprechende Mengen des Solvens zugesetzt. Damit sollte eine Eigenwirkung von DMSO quantifiziert oder ausgeschlossen werden. Außerdem wurden für jede andere Behandlungsart unbehandelte Kontrollen mitgeführt, denen entsprechende Mengen an TALP- Medium zugefügt wurden.

Der akrosomale Status wurde im Epifluoreszenzmikroskop unter 400-facher Vergrößerung, bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm für FITC, beurteilt:

Akrosomintakte Spermien zeigten in der FITC-PSA-Färbung eine gleichmäßig intensive Grünfärbung über der gesamten akrosomalen Region. Vollständig akrosomreagierte Spermien hingegen zeigten keine Färbung der Kopfkappe,

sondern lediglich ein grün-fluoreszierendes Band im Bereich der Äquatorialregion, das sogenannte Äquatoralsegment, das beim Eberspermium halbmondförmig sein kann.

Zur Auswertung wurden Fünffachbestimmungen an den zu untersuchenden Proben durchgeführt, wobei in fünf verschiedenen Vertiefungen jeweils 200 Spermien beurteilt wurden. Hierbei wurde zwischen „akrosomreagiert“ und „nicht akrosomreagiert“ sowie „nicht zuzuordnen“ unterschieden. Bei der Auswertung wurden nur die eindeutig akrosomreagierten Spermien berücksichtigt.

### 3.1.9.2 Akrosomreaktion an intakten Zonae

Dieser Assay wurde nach dem Muster des unter 3.9 beschriebenen ZPBA durchgeführt.

#### 3.1.9.2.1 Fixierung, Lyse und Färbung

Anders als beim Zona pellucida Bindungs Assay wurden die Spermien-Zona-Komplexe nach ihrer Fixierung in Ethanol (70 %) für nur 10 s in Citratpuffer (pH 2) lysiert und die Objektträger anschließend mit PBS gespült. Die nach Auflösung der Zona freigesetzten Spermien wurden 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur mit 50 µl FITC-PNA (2 µg/ml) gefärbt und mit 50 µl EthD-1 (4 µM) gegengefärbt. Dabei färbt FITC-PNA die äußere Akrosommembran und EthD-1 die DNA der Spermien an. Nach Abschluss der Färbung wurden die Proben mit Aqua bidest gespült und bei 30°C getrocknet.

#### 3.1.9.2.2 Auswertung der FITC-PNA / EthD-1-Färbung

Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung und einer Anregungswellenlänge von 488 nm für FITC und 568 nm für EthD-1-DNA. Zur Einteilung des akrosomalen Status wurden folgende Kriterien angewandt, wobei die aus der ZP freigesetzten Spermien gezählt und die PTX-vorbehandelten Spermienpopulationen mit den nicht vorbehandelten verglichen wurden: Alle an die Hemizonae gebundenen Spermien zeigten eine Fluoreszenz im Kopfbereich, ausgelöst durch die DNA-Färbung mit EthD-1. Im Falle der FITC-PNA-Färbung war die sichtbare Fluoreszenz auf die akrosomale Region beschränkt. Weiterhin war in diesem Falle eine Überlappung der Fluoreszenzen von FITC-PNA und EthD-1 sichtbar.

Nach der FITC-PNA-Färbung konnten drei Fluoreszenzverteilungsmuster unterschieden werden: 1. intensive, gleichmäßige Fluoreszenz der akrosomalen Region; 2. verschiedene Stufen fleckiger, ungleichmäßiger Fluoreszenz über der akrosomalen Region oder auf die Äquatorialregion beschränkte Fluoreszenz; 3. keine Fluoreszenz über der Kopfkappenregion (Fazeli et al. 1997). Nach diesen Verteilungsmustern wurde die Einteilung des akrosomalen Status in akrosomintakt und akrosomreagiert vorgenommen. Jede von FITC-PNA ausgehende ungleichmäßige Fluoreszenz im Kopfbereich wurde als „nicht reagiert“ eingestuft.

Vorteil dieser Färbemethode gegenüber der PSA-Färbung ist die Tatsache, dass Glykoproteine der ZP weder durch das FITC konjugierte PNA, noch durch EthD-1 angefärbt werden, so dass die gebundenen Spermatozoen nahezu hintergrundfrei darstellbar sind.

Zur Einteilung des akrosomalen Status wurden die aus der ZP freigesetzten Spermien gezählt und die PTX-vorbehandelten Spermienpopulationen mit den nicht vorbehandelten verglichen. Der Mittelwert der akrosomreagierten Spermien aus der Kontrollsuspension eines Versuchstages wurde auf 100 % normiert und der Mittelwert PTX-vorbehandelter Spermien damit verglichen. Um dabei Fehler zu minimieren, die auf unterschiedlicher Oocytenreife beruhen, wurden je Versuchstag 10-fach-Bestimmungen durchgeführt. Insgesamt kommen dabei pro Versuchstag 20 Eizellen zum Einsatz. Zehn davon werden mit PTX-vorbehandelten Spermien, die anderen zehn mit Kontrollspermien inkubiert und Zählungen an jeder eingesetzten Oocyte vorgenommen.

### **3.1.10 Pertussistoxin- katalysierte $^{32}\text{P}$ -ADP-Ribosylierung von Spermienmembranen**

#### 3.1.10.1 Präparation von Spermienmembranen

Die Isolierung von Spermien-Plasmamembranen erfolgte nach einem von ALTHOUSE et al. (1995) beschriebenen Protokoll durch Stickstoffkavitation und differentielle Zentrifugation.

Zur Präparation von Spermienmembranen wurden folgende Spezies eingesetzt:

- Mensch
- Eber
- Bulle
- Maus

Als Kontrolle dienten Cholatextrakte von Rinderhirnmembranen, die von Christiane Kleuss, Institut für Pharmakologie, Fachbereich Humanmedizin, FU-Berlin, zur Verfügung gestellt wurden.

Membranen von mit oder ohne PTX-vorbehandelten HL-60-Zellen wurden von Evelyn Breitweg-Lehmann, Institut für Pharmakologie, Fachbereich Humanmedizin, FU-Berlin, zur Verfügung gestellt.

Spermien wurden wie unter 3.1.4 beschrieben gewonnen und mit PTX oder dem Solvens kapazitiert, wobei die Dichte auf  $200 \times 10^6$  Spermien/ml eingestellt worden war. Die Suspensionen wurden einmal bei  $600 \times g$  für 10 min zentrifugiert, anschließend in 12 ml Präparationspuffer (pH 7,5) aufgenommen und einmal für 15 min bei  $600 \times g$  gewaschen. Das Pellet wurde in 12 ml Präparationspuffer (pH 7,5) resuspendiert und die Suspension zur Stickstoffkavitation bei 25 bar und  $4^\circ\text{C}$  für 30 min in Stickstoff äquilibriert. Das Kavitat wurde langsam in ein Zentrifugenröhrchen abgelassen, in das 12 ml Präparationspuffer (pH 5) vorgelegt wurden. Um Zellkerne und größere Zelltrümmer zu entfernen, wurden diese für 15 min bei  $10000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei  $4^\circ\text{C}$  in einem Beckman 60 TI Starrwinkel-Rotor für 90-150 min bei  $50000 \times g$  sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit der Membranfraktion in  $100 \mu\text{l}$  Präparierpuffer (pH 5) resuspendiert und bis zum Versuchstag bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.1.10.2 Präaktivierung von PTX und ADP-Ribosylierung mit $^{32}\text{P}$ -NAD<sup>+</sup>

Plasmamembranen von Spermatozoen mit bzw. ohne PTX-Vorbehandlung wurden einmal bei 12.000 rpm für 20 min zentrifugiert, die Pellets anschließend in 800  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (25 mM TRIS; 1 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert und ein weiteres Mal für 20 Minuten bei 12000 rpm gewaschen. Die Membranpellets wurden nachfolgend mit Hilfe einer auf eine 1 ml Insulinspritze aufgesetzte Kanüle (0,45 x 25 mm) in Waschpuffer resuspendiert.

Parallel dazu wurden Rinderhirnmembranen, die zur Kontrolle der Substratverfügbarkeit für PTX dienten, nach dem selben Verfahren vorbereitet.

Zur Präaktivierung von PTX wurden 5  $\mu\text{l}$  PTX Holoenzym (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in 25  $\mu\text{l}$  reduzierenden Aktivierungspuffer überführt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Aktiviertes PTX wurde anschließend in 225  $\mu\text{l}$  PTX-Puffer bis zum Einsatz auf Eis gelagert.

Zur Nachribosylierung mit  $^{32}\text{P}$ -NAD (800 Ci / mmol spezifische Aktivität) wurden 10  $\mu\text{l}$  präaktiviertes PTX, 30  $\mu\text{l}$  Spermienmembranen und 30  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß verbracht und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert.

Der Reaktionsstop erfolgte in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 13000 rpm für 15 Minuten. Die Pellets wurden in 800  $\mu\text{l}$  Waschpuffer resuspendiert und bei 13.000 rpm , 4°C 30 min zentrifugiert.

### 3.1.10.3 SDS- Gelelektrophorese und autoradiographische Auswertung

Nach dem Waschen wurden die Membranpellets in 50 µl Laemmli-Puffer resuspendiert und die Suspension bei 60°C 10 min erhitzt, um die Membranen zu solubilisieren.

Die elektrophoretische Auftrennung der Membranproteine erfolgte durch SDS-PAGE (LAEMMLI 1970). Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend nach der Western- Blot-Technik über Nacht auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet.

Der Blot wurde für drei Tage in Dunkelheit auf eine Phospho-Imaging-Folie (Fuji Imaging Plate BAS III; Raytest, Straubenhardt) exponiert. Die autoradiographische Auswertung erfolgte anschließend mit einem Fujifilm BAS 1500 „Phosphor Imaging Plate Scanner“.

Nach der selben Methode wurden Membranen von ± PTX-vorbehandelten HL-60-Zellen zur Positivkontrolle sowie Cholatextrakte aus Rinderhirn zur Kontrolle der Substratverfügbarkeit für PTX nachribosyliert.

### **3.1.12 Auswertung**

In Abschnitt 3.1.6 wurde das Fluoreszenzspektrophotometer LS50B der Firma Perkin-Elmer und in 3.1.7 und in ein digitales Fluoreszenz-Imaging-System der Firma TILL-Photonics eingesetzt. Die Auswertung und grafische Darstellung der Versuchsabschnitte 3.1.8 und 3.1.9 erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft Excel 98.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Fluorimetrische Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in Eberspermien

Da ein schneller Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation von  $G_i$ -Proteinen durch ZP3 die AR auslösen soll, war von Interesse, welche Auswirkungen eine 6-stündige Kapazitation in Gegenwart von 1  $\mu\text{g/ml}$  PTX auf einen Mastoparan-induzierten  $Ca^{2+}$ -Influx haben würde.

Die basale  $[Ca^{2+}]_i$  der kapazitierten Eberspermien aus der Kontrollsuspension lag bei ca. 30 nM. Nach Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Mastoparan erfolgte ein schneller Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  bis auf 190 nM (Abb. 1). Nach Stimulation der Spermien mit 50  $\mu\text{M}$  Mastoparan zum gleichen Zeitpunkt war ebenfalls ein rascher  $Ca^{2+}$ -Einstrom bis auf eine  $[Ca^{2+}]_i$  von 350 nM zu verzeichnen.

Der Basalwert der  $[Ca^{2+}]_i$  in den mit PTX (1  $\mu\text{g/ml}$ ) im TALP-Medium kapazitierten Eberspermien lag unverändert bei 30 nM.

In einer ersten Messung wurden die Spermien in der Suspension mit 50  $\mu\text{M}$  Mastoparan stimuliert, woraufhin ein schneller Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  bis auf 150 nM erfolgte (Abb.1B). In einer zweiten Messung erfolgte die Stimulation der Spermatozoen mit 50  $\mu\text{M}$  Mastoparan. Der so induzierte schnelle Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  erreichte nach 300 s Werte von 380 nM (Abb. 1B).

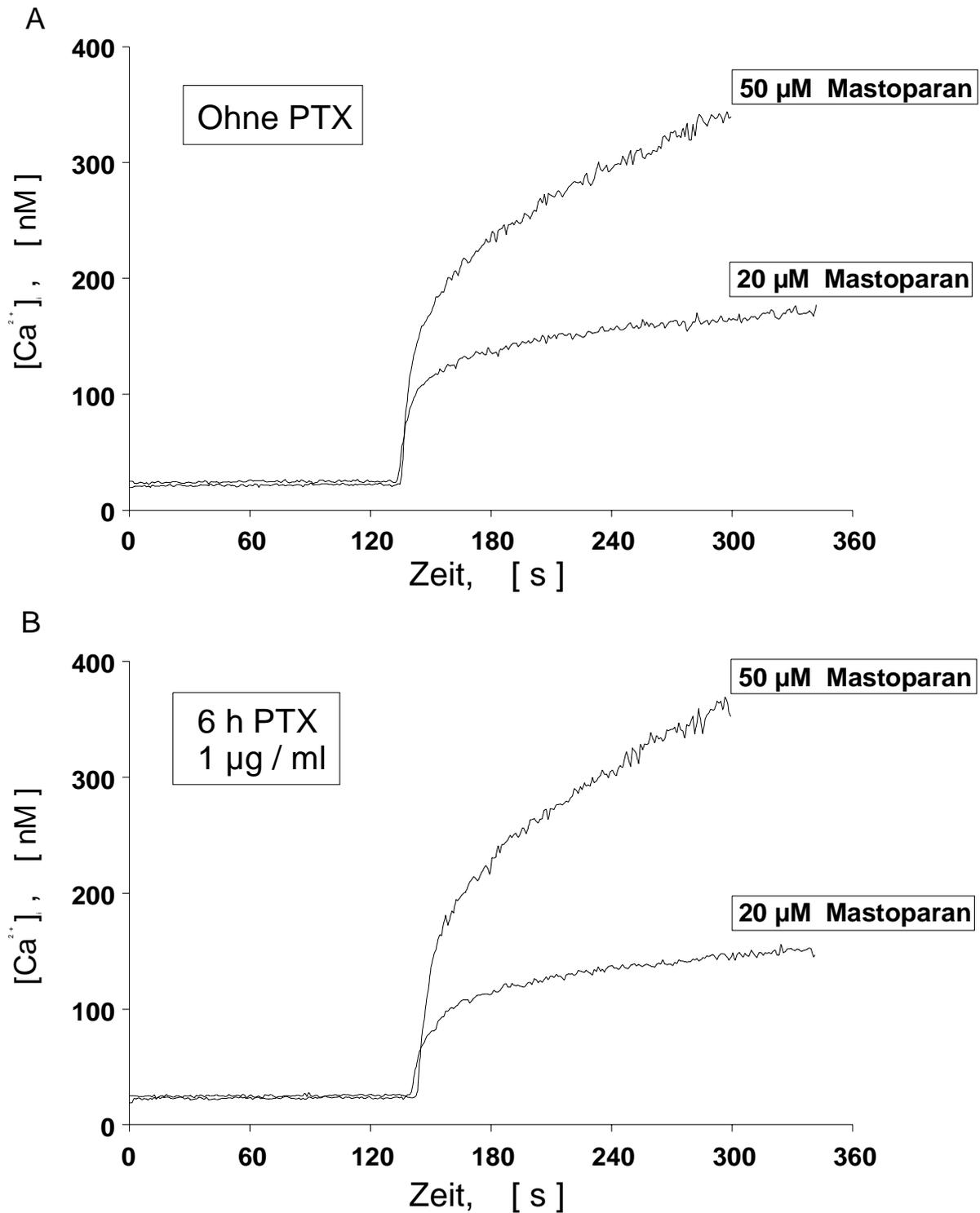


Abb.1 Mastoparan-induzierter  $Ca^{2+}$ -Influx in Eberspermien, die ohne Zusatz von PTX (Abb. 1A) resp. in Gegenwart von 1 µg/ml PTX (Abb. 1B) kapazitiert wurden. Fura-2-beladene Spermien wurden mit 20 oder 50 µM Mastoparan stimuliert und die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  fluorimetrisch bestimmt. Dargestellt ist eine von zwei Messungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Es konnte dargestellt werden, dass sowohl Spermien der Kontroll suspension als auch PTX-vorbehandelte Spermatozoen auf Stimulation mit dem  $G_i$ -Protein-Aktivator Mastoparan in Konzentrationen von 20 resp. 50  $\mu\text{M}$  mit einem schnellen, langanhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx bis auf nahezu identische Werte reagieren. Die Ergebnisse zeigen daher, dass die Mastoparan-induzierte Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  PTX-insensitiv ist.

Es stellten sich daher zwei Fragen: 1. Verliert PTX im Kapazitationsmedium während der sechsständigen Inkubation seine katalytische Aktivität, und kann deshalb  $G_i$ -Proteine in Spermien nicht entkoppeln, oder 2. ist PTX nicht in der Lage, in intakte Säugetier-Spermatozoen einzudringen, und kann deshalb  $G_i$ -Proteine nicht ADP-ribosylieren ?

#### **4.2 Nachweis der Wirksamkeit des PTX im Kapazitationsmedium**

Als Untersuchungsmodell wurden für diese Untersuchung dibutyryl-cAMP-differenzierte HL-60-Zellen gewählt, da diese in hohem Maße PTX-sensitive  $G_i$ -Proteine exprimieren (KLINKER et al. 1996). Damit ließ sich ein möglicher Verlust der katalytischen Aktivität des Toxins während der Co-Inkubation von HL-60-Zellen und Spermien in TALP anhand von Bestimmungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach Stimulation der HL-60-Zellen mit dem  $G_i$ -Protein-Agonisten fMLP leicht nachweisen.

Die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung von Calciumtransienten an mit dem Calciumindikator Fura-2 beladenen HL-60-Zellen ergab für die Solvenskontrolle einen basalen Wert von 40 nM (Abb. 2). Nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  fMLP erfolgte ein schneller Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , wobei das Maximum von 245 nM ca. 15 s nach Stimulation erreicht war (Abb. 2). Bei den HL-60-Zellen aus der mit PTX versetzten Suspension lag der Wert für das basale intrazelluläre Calcium bei 38 nM. Anders als bei den Zellen aus der Kontroll suspension erfolgte hier nach Stimulation nur ein geringer Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , wobei 60 s nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  fMLP Werte von 53 nM erreicht wurden (Abb. 2).

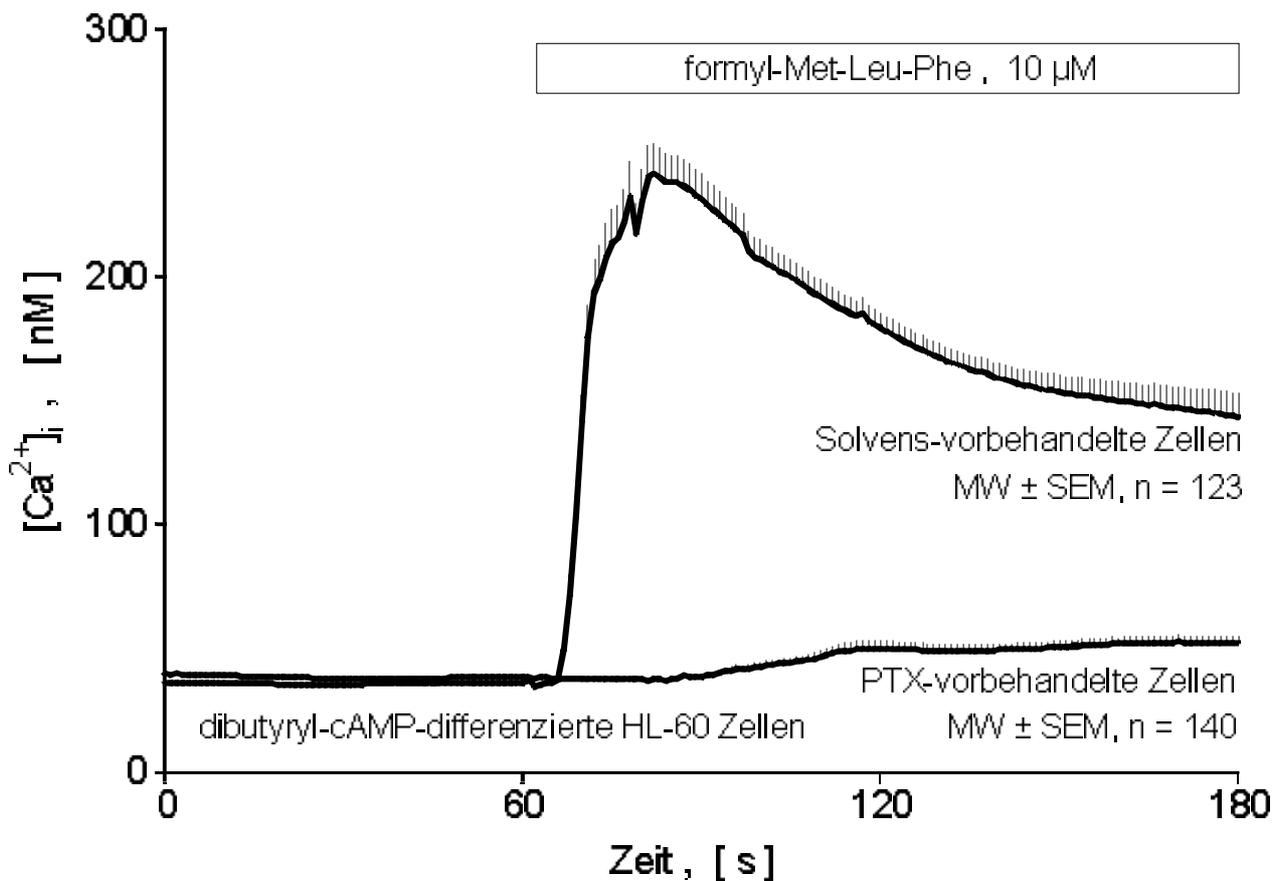


Abb.2 Zeitlicher Verlauf von Mittelwerten der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in HL-60-Zellen vor und nach Stimulation mit 10 µM fMLP. Die Zellen waren zusammen mit Eberspermien in TALP unter Zusatz von 1 µg/ml PTX resp. dem PTX- Solvens inkubiert und dann mit dem Ca<sup>2+</sup>- Indikator Fura-2 beladen worden. Die fluorimetrische Bestimmung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>- Konzentration wurde an auf Poly(L-Lysin) beschichtete Objektträger fixierten Einzelzellen vorgenommen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± SEM eines Versuchstages.

Anhand der Messergebnisse konnte gezeigt werden, dass die fMLP-induzierte Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in HL-60-Zellen PTX-sensitiv ist. Gleichzeitig wurde durch den Vergleich des Calciumtransienten der Zellen aus der Kontrollsuspension mit demjenigen der PTX-vorbehandelten Zellen nachgewiesen, dass das Toxin seine katalytische Aktivität während der Kapazitation in TALP nicht verliert und dementsprechend in der Lage ist, auch in diesem Medium G<sub>i</sub>-Proteine in intakten HL-60-Zellen zu inaktivieren.

Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob PTX während der Kapazitation in Spermatozoen eindringen kann und einen Einfluss auf die Akrosomreaktion in Eberspermien hat.

### **4.3 Zona pellucida Bindungs-assay**

Zu Beginn dieses Versuchsabschnittes sollte untersucht werden, ob PTX einen Einfluß auf die funktionelle Integrität von Säugetierspermien hat. Ein funktioneller Parameter ist die Kapazitation, die sich mit dem ZPBA direkt erfassen lässt, da nur kapazitierte Spermatozoen die Bindung an die ZP vollziehen können (CHANG 1951). Dazu wurde mit dem ZPBA ein Versuchsmodell gewählt, das einfach durchzuführen ist. Als Untersuchungsmodelle für diese Arbeit wurden Rind und Schwein gewählt, woraus sich eine Vergleichsmöglichkeit des Effekts von PTX auf die Funktion von Spermien zweier verschiedener Spezies ergab (Abb. 3).

Es wurden hierfür Rinder- und Schweineoocyten aus Ovarien von Schlachttieren gewonnen, denudiert (siehe Materialien und Methoden 3.1.5) und im jeweils homologen System mit  $\pm$  PTX kapazitierten Spermien co-inkubiert.

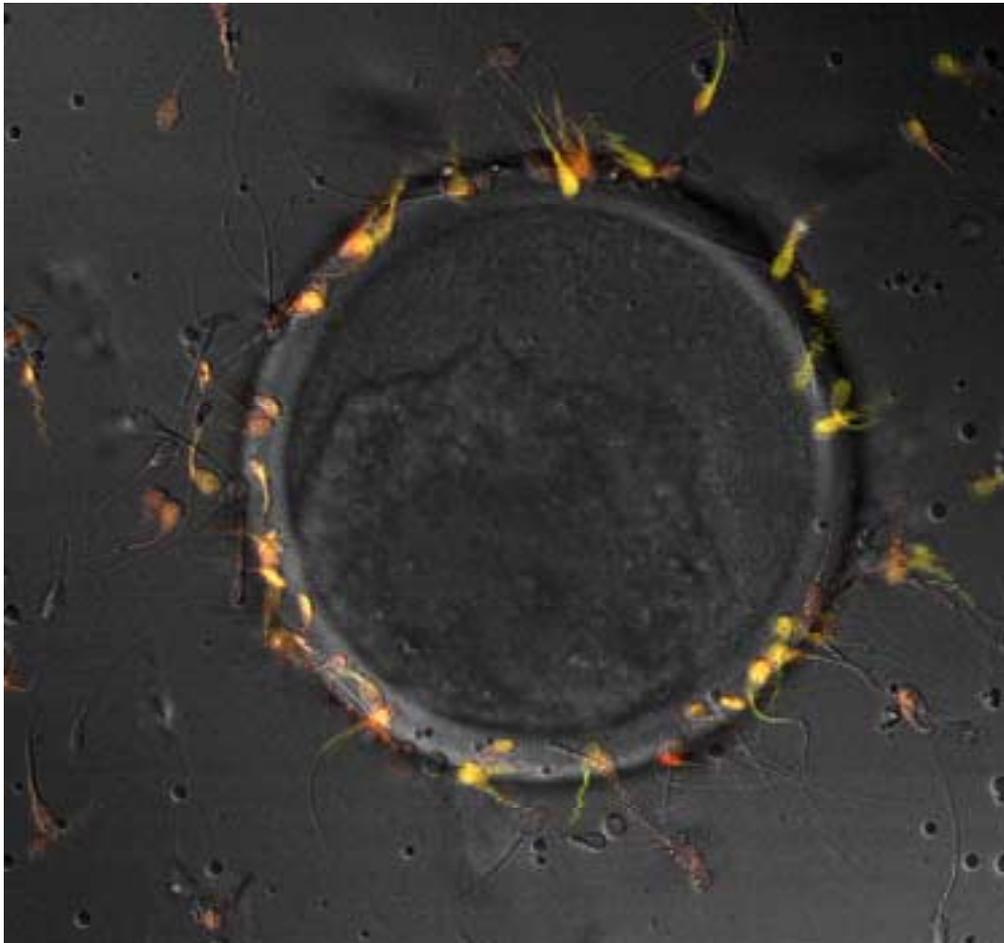


Abb. 3 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme *Zona pellucida*-gebundener, Fura-2 gefärbter Bullenspermien. Ausschnitt einer mittleren Ebene der *Zona pellucida* nach Schichtung mittels konfokaler Lasermikroskopie. Überlagerung des DIC-kontrastierten Durchlichtbildes und der bei 351 nm (Rot) und 364 nm (Gelb) angeregten Fura-2-Fluoreszenzen.

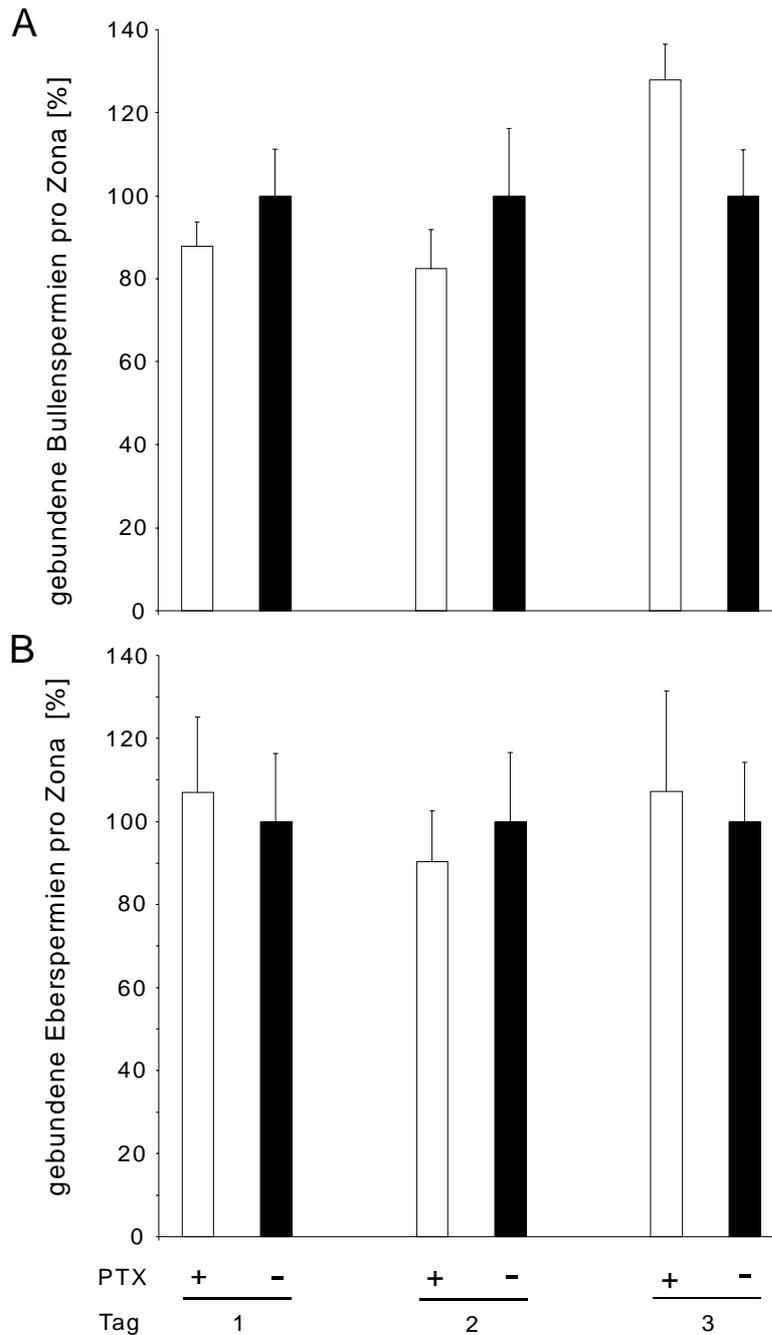


Abb.4 Bindungsraten von Bullen-und Eberspermien an homologe *Zonae pellucidae*

In die Versuche gelangten Spermien von Bulle (A) und Eber (B) an drei voneinander unabhängigen Versuchstagen, wobei die Intervalle zwischen den Ejakulatentnahmen jeweils drei Tage betragen. Pro Versuchsansatz wurden jeweils 10 Oocyten mit in Gegenwart von PTX kapazitierten resp. Spermien aus der Kontrollsuspendung coinkubiert. Diese 10-Fach-Bestimmung wurde gewählt, um systematische Fehler, die auf unterschiedlicher Oocytenreife beruhen könnten, herauszufiltern. Der Mittelwert  $\pm$  SEM der gebundenen Spermien der Kontrollsuspendung je eines Versuchstages wurde auf 100 % normiert und der entsprechende Mittelwert  $\pm$  SEM der PTX-vorbehandelten Spermien damit verglichen.

Im Vergleich mit der auf 100 % normierten Anzahl gebundener Spermien der Solvenskontrolle hatten nach PTX-Vorbehandlung im bovinen System (Abb. 3A) am ersten Versuchstag 88 %, am zweiten 82 % und am dritten 128 % gebunden.

Von den untersuchten Eberspermien (Abb. 3 B) hatten am ersten 107 %, am zweiten 90 % und am dritten Versuchstag 107 % der PTX-vorbehandelten Spermien, im Vergleich zur Solvenskontrolle, an die porcinen Zona pellucidae gebunden.

Für beide Systeme wird deutlich, dass sich die PTX-Vorbehandlung nicht auf die Bindungsfähigkeit der Spermatozoen auswirkt und sich daraus eine Beeinträchtigung der Kapazitation als Parameter für deren funktionelle Integrität nicht ableiten lässt. Eine Verminderung der Bindungsfähigkeit PTX-vorbehandelter Spermien um mindestens 50 % gegenüber der Kontrolle würde für einen Funktionalitätsverlust innerhalb der untersuchten Spermienpopulation sprechen (LEE et al. 1992).

#### 4.4 Mastoparan-induzierte Akrosomreaktion in Eberspermien

Nachdem in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass der Mastoparan-stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in Eberspermien PTX-insensitiv war, sollte nun untersucht werden, ob sich eine PTX-Vorbehandlung auf die Mastoparan-induzierte AR auswirkt.

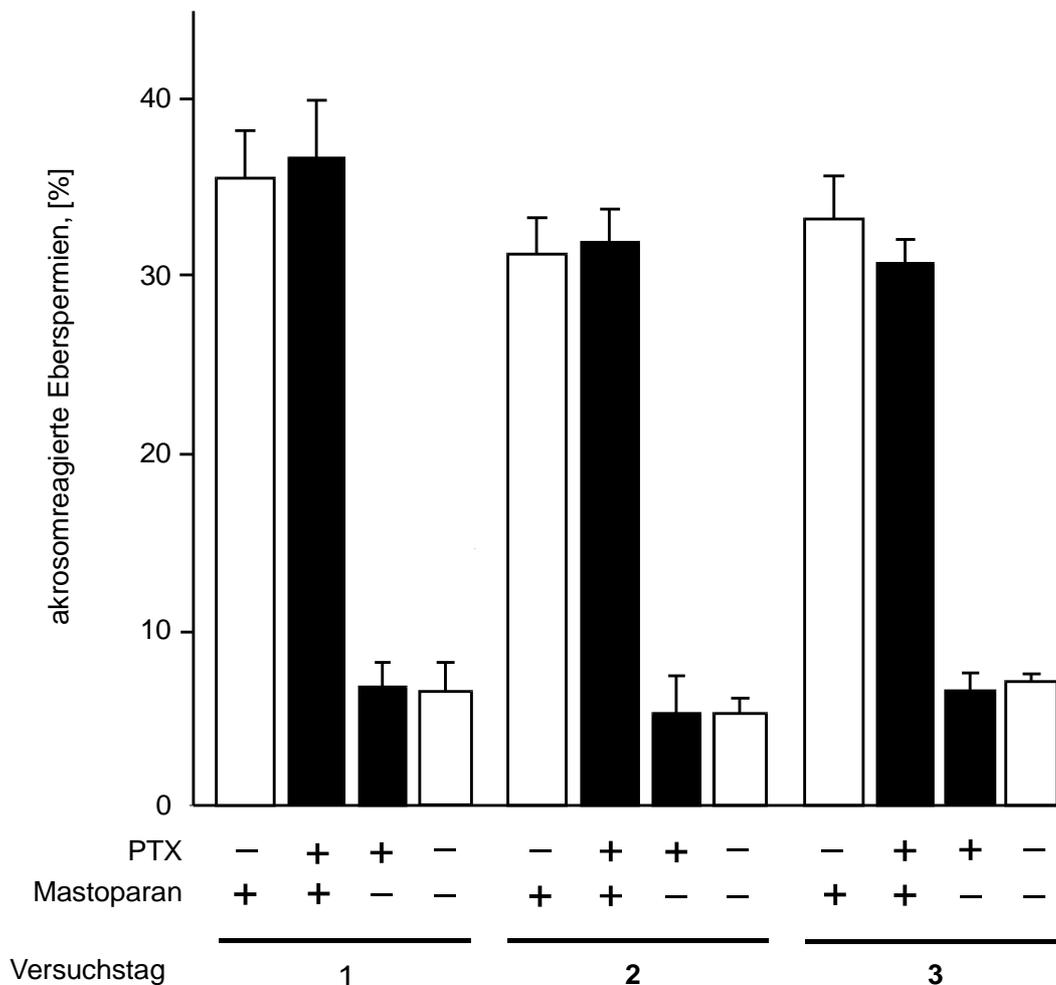


Abb. 5 Vergleich des prozentualen Anteils akrosomreagierte Eberspermien  $\pm$  PTX Vorbehandlung mit und ohne Stimulation durch Mastoparan ( $50 \mu\text{M}$ ). Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch durch Zählung der akrosomreagierten Spermien. PSA-gekoppeltes FITC färbt den akrosomalen Inhalt grün, so dass akrosomintakte Spermien über dem gesamten Kopfbereich fluoreszieren. Akrosomreagierte Spermien zeichnen sich lediglich durch ein fluoreszierendes Band im Bereich des Äquatoralsegment aus. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, wobei jeweils Fünffachbestimmungen an je 200 Spermien pro Versuchsansatz vorgenommen wurden.

Aus den vorliegenden Werten wird deutlich, dass PTX keinen Einfluss auf die spontan, also ohne Mastoparanzusatz, ausgelöste Akrosomreaktion hat. Die Werte für die Mastoparan stimulierten Eberspermien lagen allerdings deutlich höher als die Basalwerte (Abb. 5), was darauf schließen lässt, dass die Auslösung der AR G-Protein vermittelt abläuft. Ein Vergleich der in Gegenwart von PTX kapazitierten Spermien mit denen aus der Solvenskontrolle zeigt, dass die Mastoparan-induzierte AR PTX-insensitiv ist. Ausgehend von der Tatsache, dass Mastoparan G<sub>i</sub>-Proteine direkt aktiviert, so wären nach deren ADP-Ribosylierung durch PTX keine Werte über Basal zu erwarten gewesen. Die Werte der PTX-vorbehandelten Spermien unterschieden sich kaum von denen der Solvenskontrolle, lagen am ersten Versuchstag sogar um 1,1 % und am zweiten um 0,7 % höher als diejenigen der Solvenskontrolle. Diesen Beobachtungen ist zu entnehmen, dass PTX während der sechsstündigen Kapazitation nicht in der Lage war, G-Proteine der G<sub>i/o</sub>-Familie in Eberspermien von ihrem Rezeptor zu entkoppeln.

#### **4.5 Modifizierter *Zona pellucida* Bindungs Assay**

Die Ergebnisse aus 4.4 warfen die Frage auf, in wie weit sich die Behandlung der Spermien mit 1 µg / ml PTX während der sechsstündigen Kapazitation auf die durch den physiologischen Agonisten ZP 3 ausgelöste Akrosomreaktion auswirken würde. In diesem Versuchsansatz sollte die Akrosomreaktion nach Bindung von ± PTX kapazitierten Eberspermien an intakte ZP ausgelöst werden.

EthD-1 färbt die DNA der Spermien, FITC-PNA den akrosomalen Inhalt. Daher zeigten akrosomintakte Spermien eine deutliche Fluoreszenz über der Kopfkappenregion und eine Überlappung der FITC-bedingten Fluoreszenz mit derjenigen des EthD-1 im Kopfbereich (Abb. 6 A). Akrosomreagierte Spermatozoen fluoreszierten im Bereich des Kopfes, bedingt durch die Gegenfärbung mit EthD-1 und zeigten Fluoreszenz im Bereich des Äquatoralsegments (Abb. 6 B).

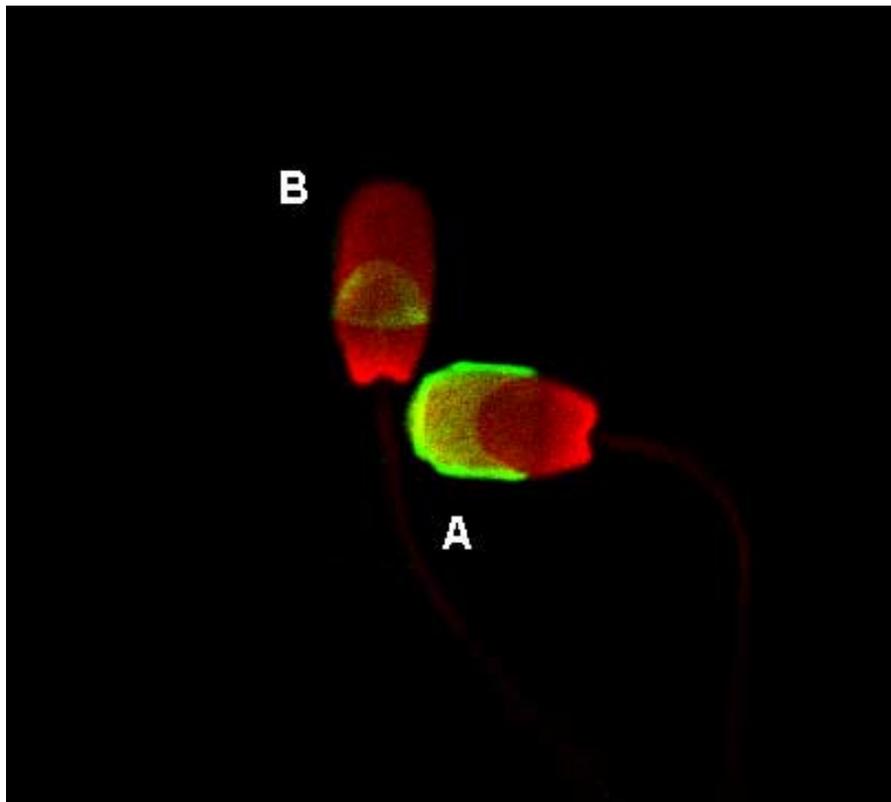


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zweier FITC-PNA / EthD-1-gefärbter Eberspermien in 3000-facher Vergrößerung. Deutlich zu erkennen ist die Überlappung beider Fluoreszenzen im Bereich der Kopfkappe (A→ akrosomintakt), die alleinige Fluoreszenz des EthD-1 im Kopfbereich und diejenige des Äquatoralsegments (B→ akrosomreagiert).

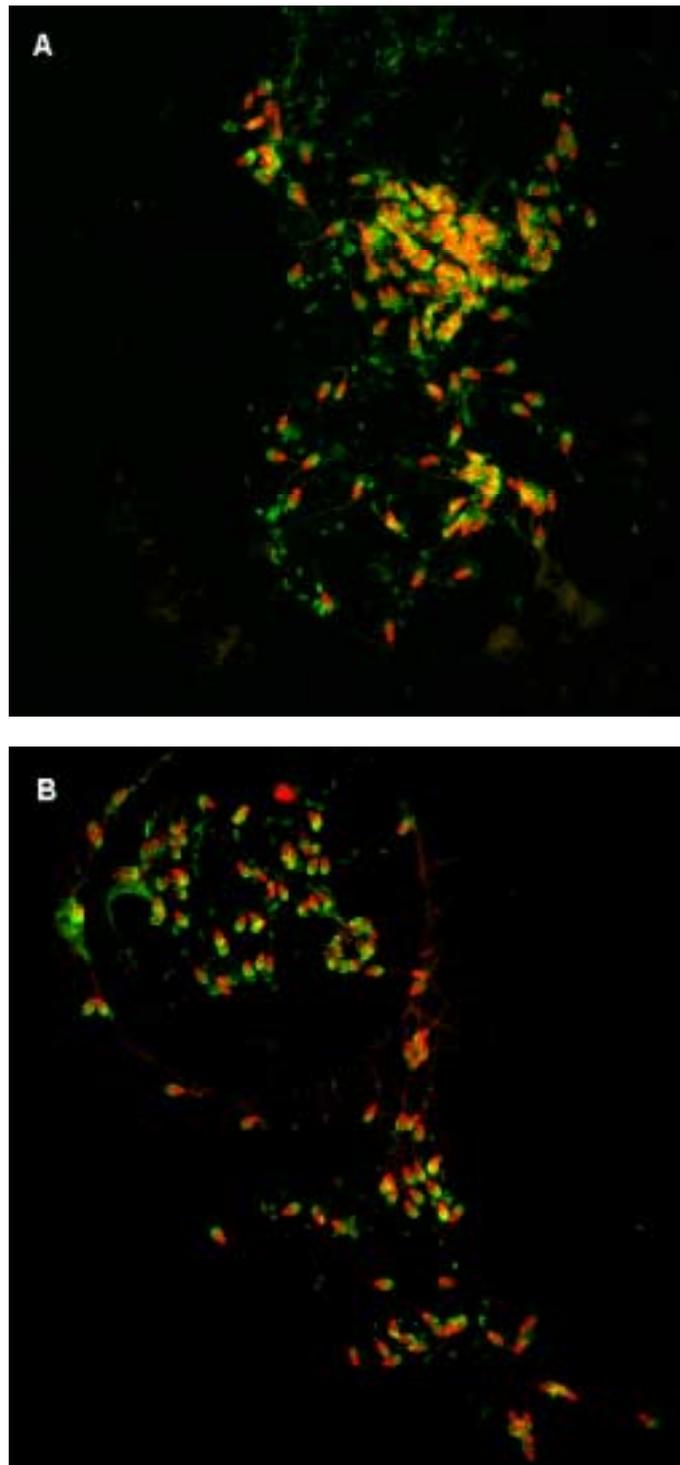


Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Eberspermien der Solvenskontrolle (A) und PTX-vorbehandelter Eberspermien (B) nach Freisetzung aus der lysierten *Zona pellucida*. Die SZK wurden fixiert, lysiert, die äußere Akrosommembran mit FITC-PNA gefärbt und die DNA mit EthD-1 gegengefärbt. Die Aufnahme erfolgte bei 250-facher Vergrößerung, in Wasserimmersion, bei einer Doppelanregung mit 488 nm für FITC-PNA und 546 nm für EthD-1.

Ein Vergleich der Bindungsraten im mZPBA (Abb. 8) bestätigt die Ergebnisse aus 4.3: Die Bindungsraten von PTX- vorbehandelten Spermien unterschieden sich nicht von jenen der Solvenskontrolle. Es lässt sich daraus keine Beeinträchtigung der Kapazitation als Parameter für die funktionelle Integrität der Spermien ableiten. So zeigt der Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  SEM PTX-vorbehandelter Spermien mit den auf 100% normierten Mittelwerten der Solvenskontrolle, dass am ersten Versuchstag 97%  $\pm$  9 %, am zweiten 121%  $\pm$  9% und am dritten 111%  $\pm$  9% der in Gegenwart von 1  $\mu$ g/ml PTX kapazitierten Spermien an homologe Zonae gebunden hatten.

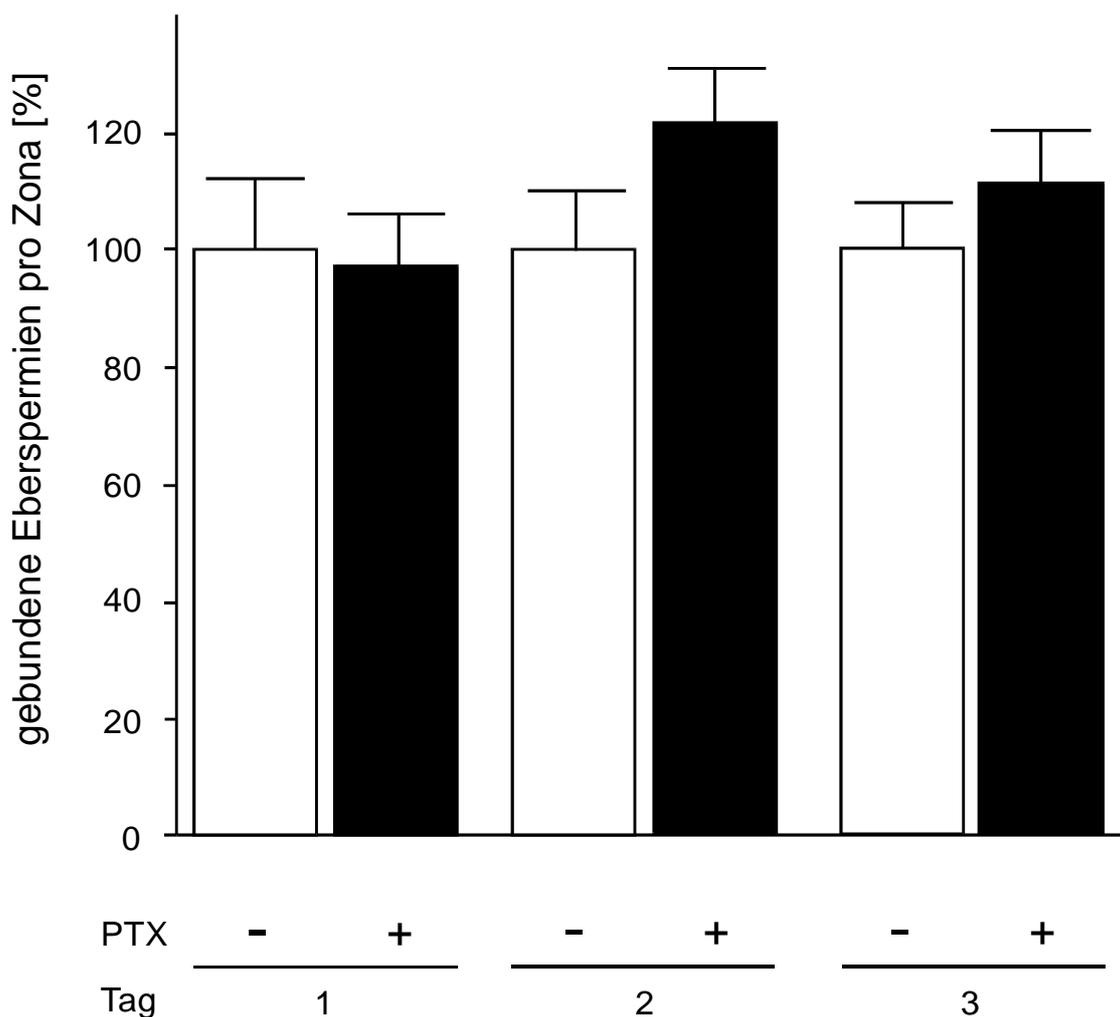


Abb. 8 Vergleich der Bindungsraten im modifizierten ZPBA. Der Mittelwert der Solvenskontrolle je Versuchstag wurde auf 100%  $\pm$  SEM normiert und der entsprechende Mittelwert der PTX-vorbehandelten Spermien  $\pm$  SEM damit verglichen. Die Werte repräsentieren Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit je n=20.

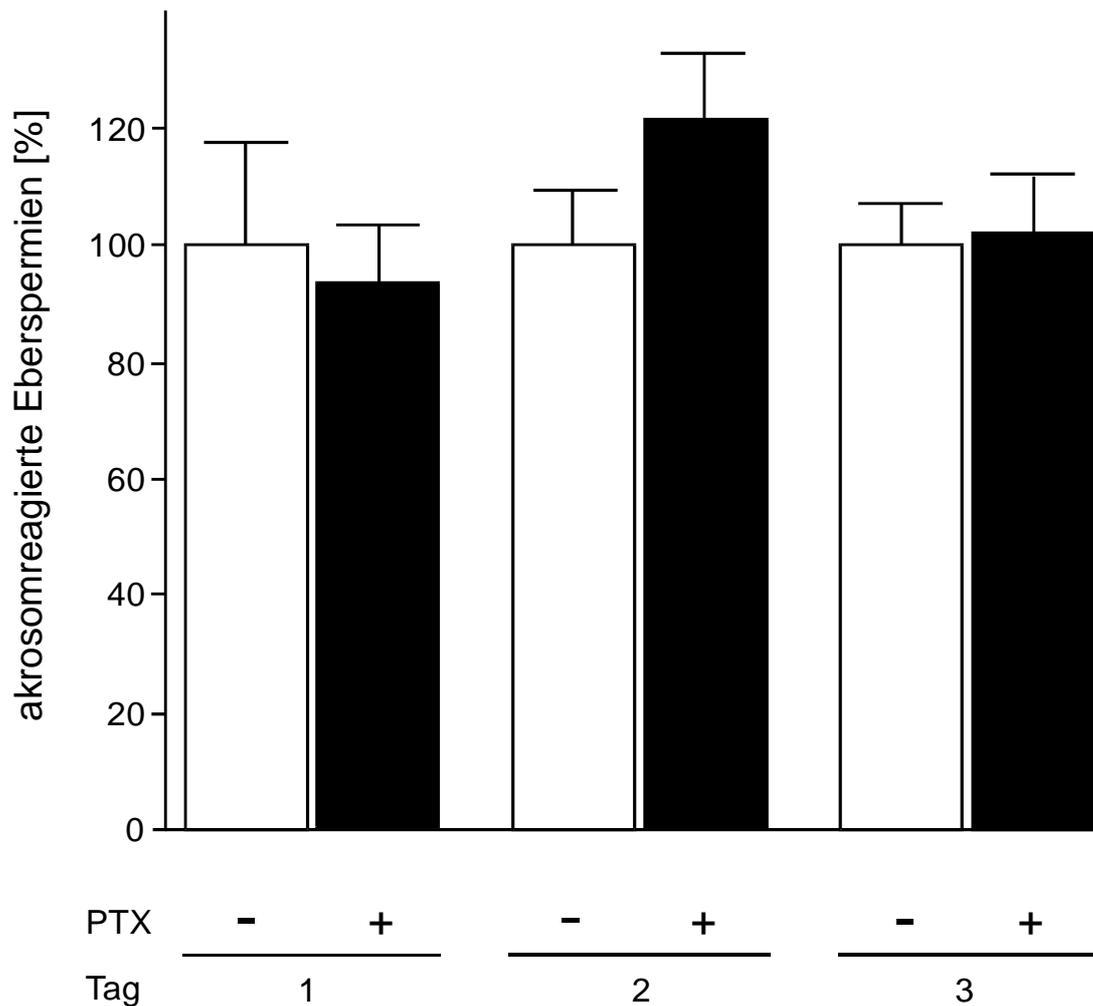


Abb. 9: Vergleich des prozentualen Anteils akrosomreagierte Eberspermien  $\pm$  PTX-Vorbehandlung nach Stimulation mit ZP 3 in intakten *Zonae pellucidae*.

Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm für PNA gekoppeltes FITC und 568 nm für EthD-1 durch Zählung der akrosomreagierten Spermien. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei voneinander unabhängig durchgeführten 10-Fach-Bestimmungen, wobei der Mittelwert der Solvenskontrolle je eines Versuchstages auf 100 %  $\pm$  SEM normiert und der entsprechende Mittelwert  $\pm$  SEM der mit PTX kapazitierten Spermien damit verglichen wurde.

Wie aus Abb. 9 deutlich wird, ist durch Zusatz von PTX zum Kapazitationsmedium keine Hemmung der AR nach Bindung der Spermien an homologe *Zonae pellucidae* erfolgt. Die Werte der PTX-vorbehandelten Spermien unterschieden sich kaum von denen der Solvenskontrolle, lagen am zweiten Versuchstag sogar um 21% und am dritten um 2% höher als diejenigen der Solvenskontrolle. Es konnte somit gezeigt werden, dass die ZP3- induzierte Akrosomreaktion PTX-insensitiv ist.

Diesen Beobachtungen ist zu entnehmen, dass PTX während der sechsstündigen Kapazitation nicht in der Lage war, G-Proteine der  $G_{i/o}$ -Familie in Eberspermien zu ADP-ribosylieren.

#### **4.6 PTX-vermittelte ADP- Ribosylierung**

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche ließen daran zweifeln, ob PTX überhaupt in der Lage ist, in intakte Säugetierspermien einzudringen und dort  $G_{\alpha i}$ - Untereinheiten zu ribosylieren.

Mit der „heißen“ ADP-Nachribosylierung wurde deshalb ein biochemisches Verfahren angewandt, mit dem man  $G_{i}$ -Proteine in Spermienmembranen metabolisch markieren kann und sich der Effekt von PTX auf  $G_{i}$ -Proteine in intakten Spermatozoen direkt erfassen lässt.

##### **4.6.1 ADP-Ribosylierung an Eberspermienmembranen**

Um festzustellen, ob PTX während der 6-stündigen Kapazitation in der Lage war,  $G_{i}$ -Proteine in intakten Spermien zu ADP-ribosylieren, wurden zunächst Membranen von PTX-vorbehandelten Eberspermien mit  $^{32}\text{P-NAD}^+$  als Substrat nachribosyliert. Parallel dazu erfolgte die „heiße“ ADP-Nachribosylierung der Membranen von Spermien der jeweils mitgeführten Solvenskontrolle.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse der autoradiographischen Auswertung wurde die photonenstimulierte Lumineszenz des Phospho-Imagers herangezogen, deren Intensität direkt mit der eingebauten Radioaktivität skaliert.

Die Autoradiographie (Abb. 10) zeigt deutlich ein ca. 40 kDa großes, durch PTX ADP-ribosylierbares Substrat, das G-Proteinen der  $G_{i}$ -Familie entspricht. Gleichzeitig wird anhand der Schwärzung der Banden deutlich, dass sich der Einbau von Radioaktivität in Membranen PTX- bzw. Solvens vorbehandelter Eberspermien nicht

voneinander unterscheidet. Starker Einbau von Radioaktivität ist in Membranen aus Rinderhirn zu verzeichnen, die nach demselben Verfahren ADP-ribosyliert und zur Kontrolle der Substratverfügbarkeit mitgeführt wurden. Dies zeigt, dass sich Substratverfügbarkeit oder die enzymatische Aktivität des präaktivierten Toxins nicht limitierend auf den Einbau von Radioaktivität auswirkten.

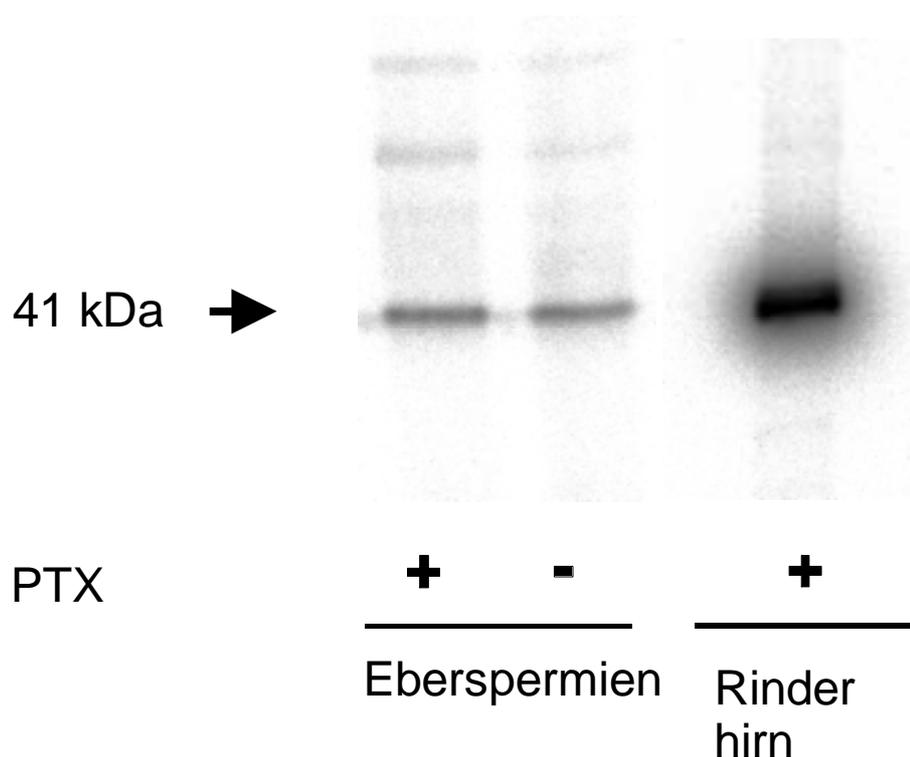


Abb. 10 Autoradiographische Auswertung der PTX- katalysierten „heißen“ ADP-Nachribosylierung von Eberspermienmembranen.

Eberspermien waren in der Anwesenheit von PTX (1 µg/ml) resp. dem Solvens kapazitiert worden. Die durch Stickstoffkavitation und Ultrazentrifugation präparierten Spermienmembranen wurden durch *in-vitro* aktiviertes PTX mit  $^{32}\text{P-NAD}^+$  als Substrat ADP-nachribosyliert und die Membranproteine mittels SDS-page aufgetrennt.

Membranen aus Rinderhirn wurden nach der selben Methode ADP-nachribosyliert und zur Kontrolle der Substratverfügbarkeit mitgeführt. Abgebildet ist einer von 12 unabhängigen Versuchen.

#### 4.6.2 ADP-Ribosylierung an HL-60-Membranen

PTX-sensitive G-Proteine der  $G_i$ -Familie bilden den Hauptanteil der G-Proteinausstattung in HL-60-Zellen (KLINKER et al. 1996). Deshalb wurden Membranen von PTX-bzw. Solvens-vorbehandelten HL-60-Zellen in einem Kontrollexperiment der „heißen“ ADP-Nachribosylierung unterzogen, um die Wirkung von PTX auf  $G_i$ -Proteine darzustellen. Die Ergebnisse dienen im Vergleich zu den porcinen Spermatozoen als Positivkontrolle. Die Autoradiographie zeigt deutliche Unterschiede im Einbau von Radioaktivität in Membranen PTX-vorbehandelter Zellen im Vergleich zur Solvenskontrolle (Abb. 11). Daraus lässt sich folgern, dass PTX zuvor in der Lage war,  $G_i$ -Proteine in intakten HL-60-Zellen zu ADP-ribosylieren. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen aus 4.2, die anhand von  $Ca^{2+}$ -Transienten zeigten, dass PTX in der Lage war,  $G_i$ -Proteine in intakten HL-60-Zellen zu entkoppeln und dadurch den fMLP-induzierten  $Ca^{2+}$ -Influx zu hemmen.

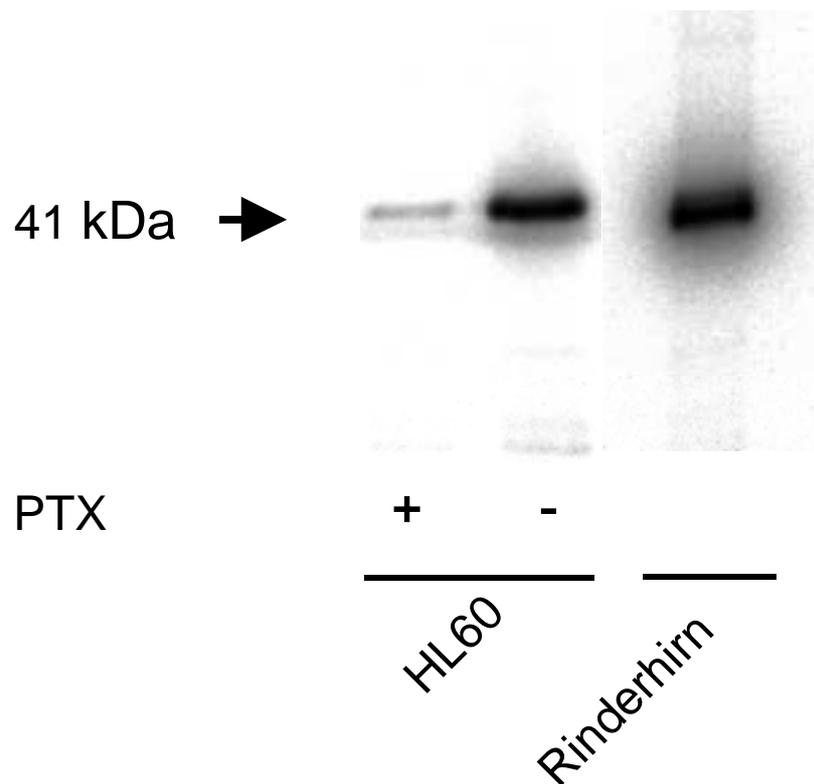


Abb. 11 Autoradiographische Auswertung der Nachribosylierung von HL-60-Zellmembranen mit  $^{32}P$ -NAD<sup>+</sup> als Substrat für *in-vitro* aktiviertes PTX. Auch in diesem Versuch wurden Cholatextrakte von Rinderhirnmembranen zur Kontrolle der Substratverfügbarkeit nach demselben Versuchsprotokoll „heiß“ ADP-ribosyliert. Abgebildet ist das Ergebnis eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Um die Ergebnisse der Autoradiographien zu quantifizieren, wurde die Photonenstimulierte Lumineszenz (PSL) als Parameter für den Einbau von Radioaktivität in die Membranen herangezogen. Befunde der autoradiographischen Auswertung sowohl der Eberspermienmembranen bestätigend, wird die PSL lediglich um 0,2% im Vergleich zu derjenigen der Membranen aus der Solvenskontrolle reduziert. Bei den HL-60-Membranen hingegen war eine Abnahme der PSL von 97,6% verglichen zur Kontrolle zu verzeichnen.

Diese Befunde sprechen dafür, dass PTX in der Lage war, G<sub>i</sub>-Proteine in intakten HL-60-Zellen, nicht aber in intakten Eberspermien zu ADP-ribosylieren, was sich in dem deutlich schwächeren Einbau von Radioaktivität in Membranen PTX-vorbehandelter Zellen, verglichen mit der Solvenskontrolle nach der heißen Nachribosylierung zeigt.

#### **4.6.3 Vergleichende ADP-Ribosylierung**

Um zu untersuchen, ob sich die anhand des porcinen Modells erzielten Ergebnisse auf andere Spezies übertragen lassen, wurden weitere Experimente an Spermienmembranen von Mensch, Maus und Rind durchgeführt.

Die Autoradiographien ergaben für menschliche und murine Spermien Ergebnisse, die mit den im Ebermodell erhobenen Befunden vergleichbar sind (Abb. 12). Große Unterschiede zu den anderen Spezies ergaben allerdings die Untersuchungen an Membranen von  $\pm$  PTX-vorbehandelten Bullenspermien. Die autoradiographische Auswertung (Abb. 12) zeigt keine Bande in der Höhe von 41 kDa, was dafür spricht, dass G<sub>i</sub>-Proteine in Bullenspermien nicht bzw. in viel geringerem Ausmaß als in den Spermien der anderen untersuchten Spezies exprimiert werden.

Als Positivkontrolle wurden in diesem Experiment Membranen von HL-60-Zellen mitgeführt, bei denen sich ein weitaus geringerer Einbau von Radioaktivität in die Membranen PTX-vorbehandelter Zellen zeigt.

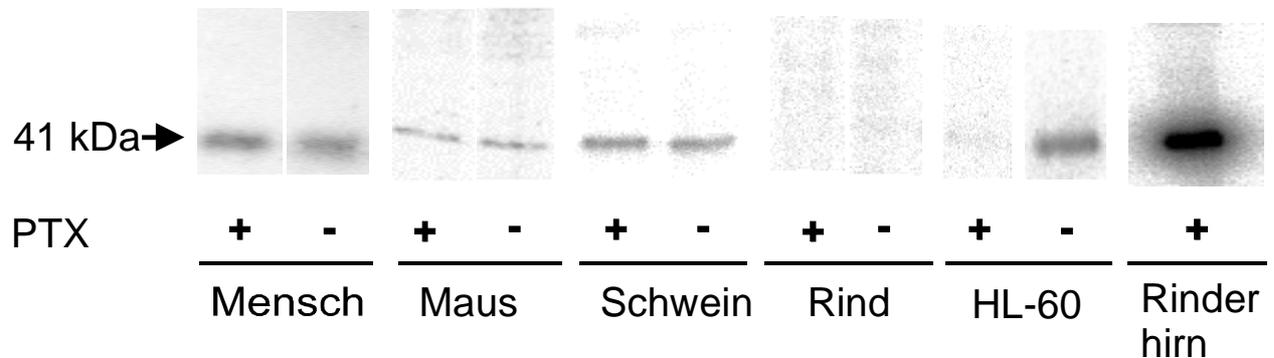


Abb. 12: Autoradiographische Bestimmung des Einbaus radioaktiv markierter ADP-Ribose durch PTX in  $G_i$ -Proteine von Human-, Mäuse-, Schweine- und Rinderspermien. Als Positivkontrolle dienen Membranen von HL-60-Zellen, bei denen ein deutlich geringerer Einbau von Radioaktivität zu verzeichnen ist. Zur Kontrolle der Substratverfügbarkeit wurden Cholatextrakte von Rinderhirnmembranen mitgeführt.

Die Ergebnisse der ADP-Ribosylierung bestätigen die Expression von  $G_i$ -Proteinen in Säugetierspermien mit Ausnahme des Rindes, in dessen Spermienmembranen kein durch PTX ADP-ribosylierbares Substrat nachweisbar war (Abb. 12). Gleichzeitig wird die anhand der Ergebnisse der anderen Experimente geäußerte Vermutung bestätigt, dass PTX während der Kapazitation nicht in der Lage ist, in intakte Säugetierspermien einzudringen, um dort  $G_i$ -Proteine zu ribosylieren. Gemäß LEE (1992) wäre im umgekehrten Falle mit einer Verringerung des Einbaus von Radioaktivität von 70-80% im Vergleich zur Kontrolle zu rechnen.

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand funktioneller und biochemischer Testverfahren systematisch den Einfluss von Pertussis-Toxin auf die an der Akrosomreaktion beteiligten G-Proteine zu untersuchen. Zwar wird in zahlreichen Publikationen die Wirkung von PTX auf Spermienfunktionen beschrieben, es fehlen aber entscheidende Kontrollexperimente, mit denen sich die katalytische Aktivität des Toxins nachweisen lässt, um sie von einer zelltoxischen Wirkung abzugrenzen.

Ein zentrales Ereignis bei der Auslösung der Akrosomreaktion ist der Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (ARNOULT et al. 1996a, 1996b, DRAGILEVA et al. 1999). Die Kenntnis über Signaltransduktionskaskaden, die zum Einstrom von Calcium in Spermien führen, ist eher unzureichend. Gemäß FLORMAN et al. (1989, 1998) trägt eine  $G_i$ -vermittelte Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes zu einem lang andauernden Einstrom von  $Ca^{2+}$  in das Zytoplasma bei, der ausreicht, die AR auszulösen. Zur Untersuchung dieser spezifischen Rolle von  $G_i$  wurde in dieser Arbeit das Wespengift Mastoparan eingesetzt. Mastoparan ist ein amphiphiles Tetradecapeptid, das G-Proteine der  $G_{i/o}$ -Familie direkt aktiviert. PTX-vermittelte ADP-Ribosylierung hemmt die durch Mastoparan stimulierte Aktivierung dieser GTPasen (HIGASHIJIMA et al. 1988, 1990). Die im ersten Versuchsabschnitt dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von Mastoparan (20  $\mu$ M und 50  $\mu$ M) bewirkten einen dauerhaften Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in kapazitierten Eberspermien auf über 300 nM. Diese Konzentration ist gemäß ARNOULT et al. (1996 b, 1999) und FLORMAN (1994) ausreichend, die Akrosomreaktion auszulösen. Stimulation der Spermatozoen mit Mastoparan nach Kapazitation mit 1  $\mu$ g/ml PTX für 6 Stunden erzeugte nahezu identische Werte der  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich mit der Kontroll suspension. Ausgehend von der Hypothese, dass PTX  $G_i$ -Proteine in Spermien durch ADP-Ribosylierung funktionell inaktiviert, wäre bei PTX-vorbehandelten Spermien nach Stimulation mit Mastoparan kein  $Ca^{2+}$ -Influx zu erwarten gewesen. Es zeigt sich also, dass die Mastoparan-induzierte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  PTX-insensitiv ist.

Da verschiedene Autoren die Wirksamkeit von PTX auf GTPasen in Spermien, auch in der hier verwendeten Konzentration von 1 µg/ml, beschreiben (FLORMAN et al. 1989, LEE et al. 1992, SHI et al. 2001), stellte sich im Laufe der Untersuchungen die Frage, ob PTX während der Kapazitation seine katalytische Aktivität verliert oder ob es gar nicht in der Lage ist, die Plasmamembran intakter Spermien zu überwinden und somit nicht in die Zelle gelangen kann. Um dieses Problem zu lösen, wurde mit HL-60-Zellen ein Zellsystem eingesetzt, das bekanntermaßen PTX-sensitive G<sub>i</sub>-Proteine in hohem Maße exprimiert (Klinker et al. 1996). In diesen Zellen können sowohl der Anstieg von intrazellulärem freiem Ca<sup>2+</sup> als auch die GTPase-Aktivität nach Stimulierung mit fMLP gemessen werden (HAGELÜCKEN et al. 1995). Nach gemeinsamer Inkubation dieser Zellen mit Eberspermien in TALP-Medium mit bzw. ohne Zusatz von 1 µg/ml PTX wurde fluorimetrisch die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> der jeweils mitgeführten HL-60-Zellen nach Stimulation mit fMLP (10 µM) bestimmt. Während die Zellen aus der Kontrollsuspension mit einem deutlichen Calciumeinstrom reagierten, stieg die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in den PTX-vorbehandelten HL-60-Zellen nur schwach über basal. Diese Befunde beweisen, dass PTX während der 6-stündigen Kapazitation seine Aktivität nicht verliert.

Wenn PTX nicht inaktiviert wird, weshalb war dann der Mastoparan-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Influx PTX-insensitiv, und warum brachten andere Arbeitsgruppen die Hemmung der AR mit der Inaktivierung von G<sub>i</sub>-Proteinen durch PTX in Verbindung? Es kann darüber spekuliert werden, ob das Toxin einen G-Protein-unabhängigen Effekt auf die Spermien ausübt. Beispielsweise könnte PTX zu einer sterischen Inkompatibilität zwischen Spermium und Zona pellucida führen, die eine AR verhindert. Zur Abgrenzung dieser Effekte von der katalytischen Aktivität des Enzyms wurde die Spermien-Zona-Bindung nach Kapazitation von Eberspermien mit bzw. ohne PTX als Parameter für die Funktionalität der Spermien herangezogen. Solche Spermien-Zona pellucida Bindungstests (ZPBA) sind in der Humanmedizin weit verbreitete diagnostische Hilfsmittel bei der Untersuchung der Infertilität (OEHNINGER et al. 1997, LIU und BAKER 1994). Ausgehend von der Tatsache, dass nur kapazitierte Spermien fest an die Zona binden können (CHANG 1957) und die Kapazitation ein Parameter für die Funktionalität von Spermien darstellt (BLOTTNER 1989), lässt sich ein derartiges Testsystem auch zur Untersuchung der Effekte von PTX auf die Kapazitation und die nachfolgende Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida

anwenden. Der in dieser Arbeit am bovinen und porcinen Modell angewandte ZPBA basiert auf einem Test nach LIU und BAKER (1994), der die Fähigkeit der Spermien, in die Zona pellucida eindringen zu können, untersucht.

Der Assay wurde dahingehend modifiziert, dass die gewaschenen Spermien-Zona-Komplexe nicht intakt lichtmikroskopisch untersucht wurden. Vielmehr erfolgte die Bestimmung der Anzahl vormals gebundener Spermien fluoreszenzmikroskopisch nach deren Freisetzung aus der Zona durch Lyse mit Citratpuffer (pH 2) und Färbung ihrer DNA mit dem Farbstoff bis-Benzimid. Bei den bisherigen Verfahren wurde licht- oder fluoreszenzmikroskopisch die Anzahl gebundener Spermien an intakten Zona-Spermien-Komplexen bestimmt. Als problematisch ergab sich dabei allerdings die exakte Auszählung der Spermien an der intakten Zona, da am dreidimensionalen Objekt nicht alle Ebenen gleichzeitig ausgewertet werden können. Die Freisetzung der Spermien ermöglicht bei dieser Methode deshalb eine wesentlich genauere Bestimmung vormals gebundener Spermatozoen, da sie durch Lysis der Zona alle auf einer Ebene verteilt sind. Eine erste Kontrolle auf zytotoxische Effekte von PTX erfolgte bereits während und nach Abschluß der Kapazitation, indem die Vitalität der Spermien in Suspension mit 1 µg/ml PTX anhand ihrer Vorwärtsbeweglichkeit bestimmt und mit derjenigen der Spermien aus der Kontrollsuspension verglichen wurde. Diese war an allen Versuchstagen sowohl bei Eber als auch bei Rinderspermien größer als 50%, was als Mindestanforderung an in die Versuche eingehende Spermisuspensionen gestellt worden war. Diese Befunde gaben einen ersten Hinweis darauf, dass PTX nicht spermatotoxisch ist. Diesen Verdacht bestätigten Vergleiche der mittleren Bindungsraten von PTX-vorbehandelten Spermien mit Kontrollspermien im bovinen und porcinen System. Verglichen mit den jeweils auf 100% normierten Mittelwerten der Kontrollspermien ergaben sich bei den PTX-vorbehandelten Bullenspermien Bindungsraten von  $88 \pm 6$  % am ersten,  $83 \pm 9$  % am zweiten und  $128 \pm 9$  % am dritten Versuchstag. Bei den Eberspermien lagen die Bindungsraten bei  $107 \pm 18$  % am ersten,  $90 \pm 12$  % am zweiten und wiederum  $107 \pm 24$  % am dritten Tag. Aus diesen Zahlen lässt sich keine Beeinträchtigung der Spermien-ZP-Bindung erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Kapazitation als Parameter für die funktionelle Integrität nicht durch die Inkubation von Spermien mit PTX beeinträchtigt wird. In Verbindung mit der unveränderten Vorwärtsbeweglichkeit der Eber- resp. Bullenspermien wird ein

unspezifisch zytotoxischer Effekt des Toxins, der zur Hemmung der AR führt, ausgeschlossen. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde von LEE et al. (1992), der an menschlichen Spermien zeigte, dass sich ihre Bindungsfähigkeit an strukturell intakte ZP nach Behandlung mit PTX nicht von derjenigen der Kontrollspermien unterschied. Ebenso demonstrierte KOPF (1988) ein solches Verhalten für Mäusespermatozoen und FRANKEN et al. (1996) für humane Spermien. Letzterer beobachtete sogar eine höhere Bindungsfähigkeit PTX-vorbehandelter Spermien im Vergleich zur Kontrolle.

Es war wichtig, diese funktionellen Tests durchzuführen, denn nachdem erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von G<sub>i</sub>-Proteinen an der Akrosomreaktion mit Hilfe von Pertussistoxin erarbeitet worden waren (BENTLEY et al. 1986, KOPF et al. 1986), stellte sich KOPF (1988) die Frage, ob die Hemmung der AR nicht auf einer Veränderung der Spermienoberfläche durch PTX bedingt sein könnte. Letztere würde während der Gameteninteraktion eine unspezifische Hemmung der AR hervorrufen. Da es aber keine Hinweise auf eine verminderte Bindungsfähigkeit PTX-vorbehandelter Spermien gibt, werden sterische Probleme bei der Zona-Bindung ausgeschlossen. Der Ort eines solchen hemmenden Effekts muss in der Signalkette also distal der Spermienbindung zu suchen sein (KOPF 1988). Dabei könnte es sich tatsächlich um die an der Auslösung der AR beteiligten Signaltransduktionskomponenten handeln.

Um diese Problemstellung weiter zu untersuchen, wurde die Akrosomreaktion in einem anderen Versuchsabschnitt mit dem G<sub>i</sub>-Aktivator Mastoparan ausgelöst. Nachdem die Ergebnisse der fluorimetrischen Bestimmung der  $[Ca^{2+}]_i$  bereits gezeigt hatten, dass der  $Ca^{2+}$ -Influx in Eberspermien nach Stimulation mit Mastoparan PTX-insensitiv war, sollte nunmehr untersucht werden, wie sich eine PTX-Vorbehandlung auf die Mastoparan-induzierte AR in Spermien suspensionen auswirkt. Die fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen ergaben an jedem der drei Versuchstage Werte über 30% akrosomreagerter Spermien, sowohl in den Suspensionen mit PTX-Zusatz als auch in den jeweiligen Solvenskontrollen. Am ersten und zweiten Versuchstag lagen die AR-Raten der mit PTX kapazitierten Eberspermien nach Stimulierung sogar um 1% höher als diejenigen der Spermien aus den Kontroll suspensionen. Ähnliche Ergebnisse erzielten SCHAEFER et al. (1998) an

menschlichen Spermatozoen, wobei allerdings kein Vergleich zwischen mit resp. ohne PTX kapazitierten Spermien vorgenommen wurde. Trotzdem zeigen die Resultate dieser Arbeitsgruppe deutlich, dass Mastoparan in der Lage ist, bei 49% der untersuchten Spermien eine AR auszulösen. Diese Ergebnisse liefern weitere Indizien für eine Beteiligung von GTPasen der G<sub>i</sub>-Familie an der Signaltransduktion in Spermien. Allerdings zeigen sie auch, dass die Fähigkeiten des G<sub>i</sub>-Protein-Aktivators Mastoparan, einen Ca<sup>2+</sup>-Influx sowie eine GTPase-Aktivität zu stimulieren, PTX-insensitiv sind.

Die Postulate, die Zona pellucida, oder genauer genommen ihr Glycoprotein ZP3, induziere die Akrosomeaktion über einen PTX-sensitiven, G-Protein-gekoppelten Signalweg (FLORMAN et al. 1989, ENDO et al. 1988, LEE et al. 1992, LECLERC und KOPF 1999, SHI et al. 2001) widersprachen sich mit den bis hierher in dieser Arbeit erhobenen Befunden. Obwohl die mit Hilfe von Mastoparan erzielten Ergebnisse eine Rolle von GTPasen an der AR plausibel erscheinen lassen, so widerspricht doch die PTX-Insensitivität der Mastoparaneffekte dieser Möglichkeit. Folglich war es von großer Wichtigkeit festzustellen, wie sich eine PTX-Vorbehandlung auf die Zona pellucida-induzierte AR auswirken würde. In einer Abwandlung des Zona pellucida-Bindungs-Assays wurde dazu die Akrosomreaktion an strukturell intakten Zonae ausgelöst und mit Hilfe einer Doppelfärbung durch Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1) und FITC-PNA visualisiert. Diese Färbemethode ist gut dazu geeignet, akrosomintakte von akrosomreagierten Spermien zu differenzieren (FAZELI et al. 1997). Die Färbung der Spermien-DNA mit EthD-1 verursacht eine rote Fluoreszenz im Kopfbereich, FITC-PNA färbt akrosomalen Inhalt und bewirkt grüne Fluoreszenz im Kopfkappenbereich, wodurch es hier zu einer Überlappung beider Fluoreszenzen kommt. Berücksichtigt wurden bei der Beurteilung nur Spermien, welche die AR zweifelsfrei vollzogen hatten, also im Kopfbereich rot und im Äquatorialbereich halbmondförmig grün fluoreszierten. Jegliche Überlagerung der Fluoreszenzen wurde als „nichtreagiert“ eingestuft. Die in der Literatur beschriebenen Färbungen sind im wesentlichen Einfachfärbungen mit Chlortetracyclin und FITC-PSA (ENDO et al. 1987 und 1988, LEE et al. 1992, CROSS et al. 1986, MERLET et al. 1999). Vorgenannte Autoren teilten die Akrosomreaktion anhand unterschiedlicher Färbemuster in drei Stufen ein: 1. Bei intaktem Akrosom fluoresziert der gesamte Spermienkopf, sogenanntes *B-pattern*. 2.

Akrosomreagierende Spermien zeigen ungleichmäßige punktuelle Fluoreszenz im Kopfbereich. Diese Stufe wird als *S-pattern* bezeichnet. 3. Akrosomreagierte Spermien ohne Fluoreszenz im Kopfbereich aber mit fluoreszierendem Band im Bereich des Äquatorialssegments. Das Unvermögen der Zellen, den Übergang von S nach B vollziehen zu können, wurde dabei bereits als Hemmung der AR bewertet. In dieser Arbeit wurden solche Einteilungen nicht vorgenommen. Dies ermöglicht eine noch kritischere Auswertung der Versuchsergebnisse, denn Spermien mit ungleichmäßiger Fluoreszenz können zwar im Begriff sein, die AR zu vollführen, andererseits ist es allerdings fraglich, ob tatsächlich alle Spermien die Färbung gleichermaßen annehmen. Aus diesem Grunde bietet die alleinige Unterscheidung in *reagiert* und *nicht reagiert* ein weitaus objektivere Grundlage für die Auswertung dieses Versuchsabschnitts. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchstagen zeigten, dass die Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion PTX-insensitiv ist. Lediglich am ersten Versuchstag lag die Rate PTX-vorbehandelter Spermien um 7% unter derjenigen der Spermien aus der Solvenskontrolle. Am zweiten und dritten Tag lagen die Werte sogar um 21% bzw. 2% über denjenigen der Kontrolle. Gründe für die Unterschiede an den verschiedenen Versuchstagen liegen an unterschiedlichen Reifegraden der zum Einsatz gekommenen Oocyten. So enthalten Zonae von Jungsaunen nur 15 ng ZP3/ZP, diejenigen von ausgewachsenen Saunen aber 25-30 ng ZP3/ZP (TÖPFER-PETERSEN pers. Mitteilung). Um die Variabilität der biologischen Reaktionen, bedingt durch unreife ZP oder solche, die Veränderungen, verbunden mit dem Polyspermieblock, erfahren hatten, zu reduzieren, kamen zufällig ausgewählte ZP aus einem Pool von 30 ZP zum Einsatz. Ähnlich waren LEE et al. (1992) bei Untersuchungen mit menschlichen Spermien und ENDO et al. (1988) mit Mäusespermien und FLORMAN et al. (1989) mit Bullenspermien verfahren. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Autoren ergaben sich auch in der vorliegenden Arbeit keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Vitalität und der Bindungsfähigkeit von Eberspermien. Gleichwohl konnte anhand der hier erzielten Ergebnisse gezeigt werden, dass die sechsstündige Inkubation von Eberspermien mit 1 µg/ml PTX die Akrosomreaktion an intakten Zonae pellucidae nicht hemmt. Letzteres steht in Widerspruch zu den Befunden der vorgenannten Autoren, die eine Hemmung der AR an PTX-vorbehandelten Spermien von bis zu 60% im Vergleich zur Solvenskontrolle beobachteten. Es kann nun spekuliert werden, die Kapazitationsdauer sei zu kurz oder die PTX-Konzentration in den Versuchen dieser

Arbeit zu niedrig. Dies kann allerdings ausgeschlossen werden, denn sowohl KOPF (1992) als auch FLORMAN (1989) setzten an humanen bzw. bovinen Spermien die selbe Konzentration (1 µg/ml) ein, kapazitierten die Spermatozoen für fünf bzw. sechs Stunden und erzielten damit die vorgenannten Ergebnisse. Wie die Ergebnisse aus 4.2 zeigen, kann auch die Hypothese nicht greifen, der Verlust der katalytischen Aktivität des Toxins während der Kapazitation bedinge das Fehlen eines hemmenden Effekts von PTX auf die Zona-pellucida-induzierte Akrosomreaktion.

Es gilt als erwiesen, dass PTX die Plasmamembran somatischer Zellen durchdringen und nachfolgend G<sub>i</sub>-Proteine durch ADP-Ribosylierung ihrer G<sub>αi</sub>-Untereinheiten funktionell inaktivieren kann (GILMAN 1984, UI et al. 1985). Nachdem die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen keine Hinweise auf eine PTX-katalysierte ADP-Ribosylierung in Spermatozoen ergaben, die Wirksamkeit des in diesen Versuchen eingesetzten Toxins jedoch durch Kontrollzellen erwiesen war, wurde anhand eines biochemischen Verfahrens untersucht, ob PTX überhaupt in der Lage ist, während der sechsständigen Kapazitation die Plasmamembran intakter Spermatozoen zu durchdringen. Grundlage war die ADP-Ribosylierung mit <sup>32</sup>P-NAD<sup>+</sup> als Substrat für PTX nach einem Protokoll von KOPF et al. (1986), dem damit erstmals die Identifikation eines „G<sub>i</sub>-ähnlichen“ Proteins in Spermienextrakten von Intervertebraten und Säugetieren gelang. Gemäß LEE et al. (1992) ist PTX auch an intakten menschlichen Spermien in der Lage die Plasmamembran zu überwinden und nachfolgend G<sub>i</sub>-Proteine zu ADP-ribosylieren. Die Ergebnisse der ADP-Nachribosylierungen an Spermienmembranen in diesen Arbeiten ergaben allerdings lediglich eine Reduktion der Radioaktivität um ca. 50% und nicht wie erwartet 90% und mehr. Diesbezüglich brachte die Nachribosylierung der Membranen von zuvor mit 1 µg/ml PTX kapazitierten Eberspermien mit <sup>32</sup>P-NAD<sup>+</sup> als Substrat für *in vitro* aktiviertes PTX in der vorliegenden Arbeit widersprüchliche Ergebnisse. Während die Expression von G<sub>i</sub>-Proteinen in Eberspermien bestätigt werden konnte, wurde gleichzeitig nachgewiesen, dass PTX im Zuge der sechsständigen Kapazitation nicht in der Lage war, in intakte Spermien einzudringen und nachfolgend G-Proteine der G<sub>i</sub>-Familie zu ribosylieren, nicht einmal zu 50 %, wie von ENDO (1987) an murinen Spermien und LEE (1992) an humanen Spermien gezeigt worden war. Ein solches Verhalten ist auch von Sf9 Insektenzellen (MULHERON et al. 1994) und

Thrombozyten (BRASS et al. 1990) bekannt. Hätte das exogen zugesetzte Toxin bereits vorher G<sub>i</sub>-Proteine ribosyliert, so wäre im Vergleich zur Kontrolle ein deutlich geringerer Einbau von Radioaktivität zu erwarten. Die autoradiographischen Auswertungen von 12 unabhängigen Versuchen ergaben aber keinen Unterschied zwischen PTX-behandelten und Kontrollspermien. Bestätigt wurden die Ergebnisse der Autoradiographien durch Bestimmung der Photonen-stimulierten Lumineszenz, die bei Membranen von PTX-behandelten Eberspermien im Vergleich zur Kontrolle lediglich um 0,2% reduziert war. Diese Ergebnisse waren auch auf murine und humane Spermatozoen übertragbar.

Bei den als Positivkontrolle mitgeführten Membranen von HL-60-Zellen wird autoradiographisch ein großer Unterschied im Einbau von Radioaktivität sichtbar, der eine Abnahme der PSL um 97,6% in Membranen PTX-vorbehandelter Zellen ergab. Dies zeigt deutlich, dass das Toxin während der sechsstündigen Inkubation in der Lage war, in HL-60-Zellen zu gelangen und dort nachfolgend die ADP-Ribosylierung von G<sub>i</sub>-Proteinen zu katalysieren.

Eine Sonderstellung scheinen Bullenspermien einzunehmen. Die Autoradiographien von Bullenspermienmembranen ergaben lediglich sehr schwache Signale. Frühe Arbeiten von BENTLEY et al. (1986) und KOPF et al. (1986) diskutieren zwar die Existenz von G<sub>i</sub>-Proteinen in Bullenspermien, die Ergebnisse diesbezüglich sind allerdings wenig überzeugend. So zeigen auch die autoradiographischen Auswertungen von KOPF (1986) einen nur sehr schwachen, kaum sichtbaren Einbau von Radioaktivität in Membranextrakte von bovinen Spermatozoen. Er begründet dies damit, dass die Spermien bereits ein bis zwei Stunden alt waren, bevor sie in Wasch- und Extraktionspuffer überführt wurden. Dieser Gesichtspunkt ist insofern von Bedeutung, als dass Bullenspermien besonders reich an Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen sind, was eine Selbstverdauung von Membranproteinen möglich erscheinen lässt (JOHNSON et al. 1985). Die von KOPF (1986) vorgeschlagene Lösung des Problems, frische Ejakulate einzusetzen, ist in dieser Arbeit berücksichtigt worden. Bullenejakulate wurden nach dem Absamen bei 37°C temperiert binnen 15 Minuten ins Labor gebracht und sofort in die entsprechenden Medien eingesetzt. Aber auch der zeitlich optimierte Versuchsablauf brachte keine Verbesserung der Ergebnisse. Diese Studie konnte also zeigen, dass

Bullenspermien nur über marginale Mengen an Substrat für PTX verfügen oder sie gar keine G-Proteine der  $G_i$ -Familie exprimieren.

Dies würde die Aussage von HILDEBRANDT et al. (1985) stützen, der gezeigt hat, dass ovine, canine und humane Spermien kein Substrat für die PTX-katalysierte ADP-Ribosylierung besitzen und deshalb die Beteiligung von  $G_i$ -Proteinen an der *Zona pellucida*-induzierten Signaltransduktion ausschließt.

NING et al. (1995) zeigten die selektive Aktivierung von  $G_{i1}$  und  $G_{i2}$  in Membranen muriner Spermien durch die *Zona pellucida* und vermuteten deshalb, dass zumindest ein ZP3-Rezeptor ein GPCR sein könnte. Ein solcher Kandidat ist die  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase, deren zytoplasmatische Domäne an PTX-sensitive G-Proteine binden und diese, stimuliert durch ZP3, aktivieren und darüber die Akrosomreaktion auslösen soll (GONG et al. 1995, SHI et al. 2001). Hierbei ist anzumerken, dass GalTase zwar als ZP3-Rezeptor gut charakterisiert ist, ihre Struktur jedoch nicht die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren prototypische heptahelikale Transmembrantopologie aufweist. Stattdessen wird spekuliert, ob es sich im Fall der GalTase um einen Rezeptor mit nur einer transmembranären Domäne handelt, der aber dennoch in der Lage ist, G-Protein-Kaskaden zu aktivieren (GONG et al. 1995). Verschiedene solcher atypischer GPCR werden diskutiert (OKAMOTO et al. 1990, NISHIMOTO et al. 1993, LIANG und GARRISON 1991), wobei eine Bestätigung dieser Befunde durch unabhängige Gruppen bisher nicht vorliegt. In Anbetracht der in dieser Studie erzielten Ergebnisse muss allerdings weiterhin darüber diskutiert werden, ob die ZP3-vermittelte AR über G-Protein-gekoppelte Signalwege das einzig annehmbare Modell sein kann.

Seit langem wurde die Beteiligung von G-Proteinen der  $G_i$ -Familie an der ZP3-induzierten Akrosomreaktion postuliert (WARD et al. 1992; WARD et al. 1994; LEE et al. 1988; KOPF et al. 1986), wobei der Nachweis durch Anwendung von PTX geführt wurde. Die Effizienz der PTX-Behandlung wurde allerdings bisher oft nicht überprüft. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass PTX nicht in der Lage ist, in intakte Spermien zu gelangen bzw. dort nachfolgend  $G_i$ -Proteine zu inaktivieren. Für weitere molekular identifizierte ZP3-Rezeptoren wie Zonadhesin (HARDY und GARBERS 1995, GAO und GARBERS 1998), sp56 (BOOKBINDER et al. 1995) und die p95 Tyrosinkinase (LEYTON et al. 1992, BURKS et al. 1995), konnte man bisher

keine Kopplung an G-Proteine nachweisen, weshalb diese Studien höchst kontrovers diskutiert werden.

Während bisher für sp56 im murinen und für Zonadhesin im murinen und porcinen System lediglich eine Spezies-spezifische Bindung von Spermatozoen an die *Zona pellucida* nachgewiesen werden konnte, kommt einer 95 kDa großen *Zona pellucida*-Rezeptor-Tyrosinkinase (ZRK) eine wichtige Rolle als ZP3-Rezeptor mit intrinsischer Signalaktivität zu (LEYTON und SALING 1989, LEYTON et al. 1992, BURKS et al. 1995). Dabei ist es denkbar, dass nach Bindung von ZP3 an ZRK die an der AR beteiligte Phospholipase C bzw. deren Isoform PLC- $\gamma_1$  durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert wird, was zur Auslösung der Akrosomreaktion beiträgt (TOMES et al. 1996). Eine analoge Signalkette ist für die G-Protein-vermittelte Akrosomreaktion bisher nicht bekannt. In anderen Zellsystemen führt die Freisetzung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus aktivierten G $_i$ -Proteinen zur Aktivierung von PLC- $\beta$ -Isoformen (EXTON 1994). Ob dieses Modell auch auf Säugetierspermatozoen übertragbar ist, bedarf der weiteren Klärung und bietet einen interessanten Ansatz zur Klärung der Beteiligung von G-Proteinen an der Signaltransduktion der Akrosomreaktion. Allerdings gewinnen G-Protein-unabhängige Konzepte der Signalvermittlung in Säugetierspermien durch die hier vorgestellten Befunde neue Bedeutung und müssen zukünftig ebenso intensiv untersucht werden, wie es für die G-Protein-Hypothese bislang der Fall war.

## 6 Ausblick

Das Verständnis der für die Fertilisierung essentiellen Signalübertragungswege bildet die Grundlage für die Erforschung neuer Konzepte zur Kontrolle der Fertilität bei Säugetieren. Dabei wird es in der Humanmedizin vorrangig um die Entwicklung alternativer Methoden zur hormonellen Empfängnisverhütung oder um eine Therapie männlicher Infertilität gehen. In der Veterinärmedizin dagegen wird es hauptsächlich im Bereich der Tierzucht von Interesse sein, Fertilität gezielt positiv beeinflussen zu können, um beispielsweise wertvolle Vatiertiere auf Besamungsstationen lange als Genreserve nutzen zu können.

Um weitere Details über den Ablauf und die an der Fertilisierung beteiligten Signaltransduktionskomponenten erzielen zu können, ist es aufgrund der in dieser Studie erhobenen Befunde erforderlich, sich vom Konzept der G-Proteine in Spermien als zentrale Signalverstärker zu lösen. Vielmehr muss die Rolle anderer Signaltransduktionsmechanismen bei der Auslösung der Akrosomreaktion studiert werden. Hierbei sind auch ZP-unabhängige Prozesse von Interesse.

Da die ZP-induzierte AR von einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  abhängig ist (YANAGIMACHI 1982, 1994), stehen Ionenkanäle und ihre Regulation im Vordergrund des Interesses. Die Adhäsion des Spermiums an die *Zona pellucida* aktiviert T-Typ-Calciumkanäle (ARNOULT et al. 1996b) und löst dadurch die AR aus. In einem PTX-insensitiven und G-Protein-unabhängigen Prozess wird dabei zunächst ein nichtselektiver Kationenkanal geöffnet. Der Einstrom von Kationen in das Spermium führt zur Depolarisation und zur Aktivierung eines spannungsgesteuerten T-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanals, wodurch ein Influx von  $Ca^{2+}$  ausgelöst wird. Die daraus resultierende Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  ist ausreichend, die AR auszulösen (FLORMAN et al. 1998, ARNOULT et al. 1999). Die Aktivität dieser Kanäle wird während der Kapazitation unterbunden, indem sie eine Hyperpolarisation der Plasmamembran die Kanäle im geschlossenen Zustand hält (ARNOULT et al. 1999). Diese Erkenntnisse liefern neue Ansatzpunkte zur Entwicklung von Kontrazeptiva, die auf der Basis eines Calciumkanal-Blockers funktionieren könnten. Dabei ist es denkbar, Pharmaka einzusetzen, die bereits während der Kapazitation mit hoher Affinität an den geschlossenen Kanal binden und diesen auch nach Adhäsion des Spermiums an die ZP geschlossen halten. Die Hemmung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms würde nachfolgend die Aktivierung weiterer  $Ca^{2+}$ -abhängiger Signaltransduktionskomponenten, die an der

Auslösung der AR beteiligt sind, verhindern. Mindestens drei für die AR notwendige Vorgänge wären davon betroffen: die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Phospholipasen C (ROLDAN und HARRISON 1989, SPUNGIN et al. 1995) oder Phospholipasen A<sub>2</sub> (ROLDAN et al. 1993) sowie eine Actin-Depolymerisierung (SPUNGIN und BREITBART 1996). Somit stellt die pharmakologische Blockade von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen nicht nur im ersten Schritt sondern auch nachfolgend eine sehr effiziente Maßnahme für die Fertilitätskontrolle dar. Weiterhin muss das molekulare Korrelat des nichtselektiven Kationenkanals, dessen Aktivierung der Öffnung des T-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals vorangeht, noch geklärt werden. Auch dieser nicht-selektive Kationenkanal könnte eine pharmakologisch relevante Zielstruktur darstellen. Da bis jetzt keine gesicherten Erkenntnisse über die Signalwege zur Steuerung der Calciumkanäle in Spermien vorliegen, muss neben den Rezeptorhypothesen auch eine rein mechanische Kopplung, die zur Aktivierung der Kanäle beitragen könnte, in Betracht gezogen werden.

Eine neue Perspektive in der Signaltransduktion der Akrosomreaktion bietet der Spermien-Eizell-Rezeptor des Seeigels *Strongylus purpuratus*. Dieser Rezeptor, dessen Struktur in unabhängigen Arbeiten von OHLENDIECK et al. (1993) und FOLTZ et al. (1993) identifiziert wurde, ist ein transmembranäres Protein, das als „sea urchin receptor for egg jelly“ (suREJ) bezeichnet wird. suREJ weist eine deutliche Homologie zu mehreren Säugergenen auf, die für die sogenannte „polycystic kidney disease“ des Menschen verantwortlich gemacht werden (MOY et al. 1996). Diese als *pkd* benannten Gene codieren für verschiedene Polycystine, die ebenso wie verschiedene Kationenkanäle zur Superfamilie der hexahelikalen Kationenkanäle zu rechnen sind (TSIOKAS et al. 1997). HUGHES et al. (1999) identifizierten ein menschliches Homologes zu suREJ, das sie PKDREJ (polycystic kidney disease and receptor for egg jelly related gene) nannten, weil es sowohl zu den Polycystinen als auch zu suREJ eine signifikante Ähnlichkeit aufweist. Das PKDREJ-Transkript wird ausschließlich in Testisgewebe während der Spermienreifung gefunden. Diese Tatsache und die auffallend große Ähnlichkeit mit suREJ lassen die Vermutung zu, dass es sich bei den humanen PKDREJ-Proteinen funktionell um einen Rezeptor in menschlichen Spermien handeln könnte, der aufgrund seiner Strukturverwandtschaft ein  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kationenkanal sein könnte (MOY et al. 1996, HUGHES et al. 1999). Noch ungeklärt ist, ob es sich bei

PKDREJ um einen Rezeptors für *Zona pellucida*-Glycoproteine handelt bzw. welche Signaltransduktionskaskaden zu seiner Öffnung notwendig sind. Zwei weitere, selektiv in Testisgewebe exprimierte PKD-Homologe (PKD2-like und PKD2-like2) sind aufgrund ihrer putativ hexahelikalen Transmembrantopologie ebenfalls Kandidaten für  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle, die bei der Auslösung der Akrosomreaktion von Bedeutung sein könnten (WU et al. 1998; VELDHUISEN et al 1999)

Neuere Arbeiten haben zusätzlich die Bedeutung zweier Ionenkanäle aufgezeigt, die nicht durch die *Zona pellucida* aktiviert werden und die nicht unmittelbar an der AR beteiligt sind. Einer von ihnen ist als spannungsgesteuerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal im Hauptstück des Spermiums lokalisiert und wird als CatSper bezeichnet. Er spielt eine wichtige Rolle für die Motilität der Spermien, was an knock-out Mäusen gezeigt wurde (REN et al. 2001). So führte das Ausschalten des CatSper-Gens zu Infertilität im Mausmodell. Der zweite, CatSper2 genannte Kanal ist ein Spermien-spezifisches Protein, dessen mRNA nur in Spermiovollreiferzellen von Mensch, Ratte und Maus nachgewiesen wurde (QUILL et al. 2001). Dieser ebenfalls spannungsgesteuerte Kanal befindet sich im Schwanzstück der Spermatozoen und ist ebenso wie CatSper von Bedeutung für die Motilität. Diese Ionenkanäle eröffnen neue Perspektiven in der Erforschung von Konzepten zur Fertilitätssteuerung außerhalb der akrosomalen Ebene. Sie stellen beispielsweise exzellente Ziele für nicht-hormonelle Kontrazeptiva dar, denn gelingt es, die Motilität der Spermien zu unterdrücken, wären diese nicht in der Lage, zur Eizelle zu gelangen. Andererseits könnte auch umgekehrt die gezielte Erhöhung der Beweglichkeit von Spermatozoen mit verminderter Motilität zu einer Erhöhung der Befruchtungsleistung einzelner Individuen beitragen.

Neben der *Zona pellucida* sind auch Prostaglandine in der Lage, die AR auszulösen (MEIZEL und TURNER 1984), indem sie einen Calciuminflux durch PTX-insensitive Calciumkanäle induzieren (SCHAEFER et al. 1998). Über die Aktivierung eines  $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptors wird der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch einen nicht-selektiven Kationenkanal bewirkt (SCHAEFER et al. 1998). Es wäre interessant zu klären, ob der oben beschriebene nicht-selektive, durch ZP3 aktivierte Kationenkanal eventuell zusätzlich durch den Prostaglandinrezeptor angesteuert wird. Es würde sich daraus ein weiteres pharmakologisch beeinflussbares Ziel zur Steuerung der Fertilisierung ergeben.