

## 1 Einleitung

Die einzelnen Zellen des Organismus haben die Fähigkeit, eine Vielzahl von Informationen zu verarbeiten und zu integrieren, die ihnen über extrazelluläre Signale wie Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und Geruchsstoffe, aber auch durch physikalische Stimuli wie Licht vermittelt werden. Die meisten dieser Signale dringen physikalisch nicht in die Zelle ein, sondern beeinflussen spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die Mehrzahl der interzellulären Signalmoleküle bindet an Membranrezeptoren, die das erste Glied eines aus drei Elementen (Rezeptor, Transducer, Effektor) bestehenden transmembranären Signaltransduktionssystems darstellen. Agonist-Bindung an einen spezifischen Rezeptor führt zur Aktivierung eines heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteins (G-Protein), das als Signalverstärker fungiert. Anschließend modulieren G-Proteine die Aktivität von Effektoren wie Enzymen, Ionenkanälen und Transportern, ein Vorgang, der zur raschen Konzentrationsänderung intrazellulärer "second messenger" (z. B. cAMP, Inositolphosphate, Diacylglycerol, Arachidonsäure, intrazelluläre freie Ionen) führt (BIRNBAUMER et al. 1990; NEER 1995).

Die Signalübertragungsschritte, die zur Auslösung der Akrosomreaktion an Spermien führen, sind nur unzureichend verstanden. Das Zona pellucida-Protein 3 (ZP3) wurde als ein physiologischer Auslöser der Akrosomreaktion identifiziert. Obwohl es Hinweise für eine Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen bei der Signaltransduktion durch den genannten Agonisten gibt (WARD et al., 1992; 1994), liegen bisher keine systematischen Untersuchungen zur Expression und PTX-Sensitivität von  $G_i$ -Proteinen in Spermatozoen unterschiedlicher Spezies vor. Untersuchungen an GTPasen als möglichen Signaltransduktionskomponenten in Säugetierspermien wurden unter Verwendung von Pertussistoxin als zellbiologischem Werkzeug erzielt. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass Pertussistoxin-sensitive G-Proteine an der Akrosomreaktion beteiligt sind (LEE et al., 1992). Allerdings fehlen systematische Untersuchungen zur katalytischen Wirksamkeit des Toxins. Die vorliegende Arbeit hat deshalb das Ziel, anhand funktioneller und biochemischer Testverfahren systematisch den Einfluss von Pertussis-Toxin auf die an der Akrosomreaktion in Säugetierspermien beteiligten G-Proteine zu untersuchen.

## 2 Literatur

### 2.1 Kapazitation

#### 2.1.1 Physiologische Aspekte der Kapazitation

Nach dem Verlassen der Hoden sind die Spermien vieler Säugetierarten zwar morphologisch differenziert, aber weder beweglich noch in der Lage, eine Eizelle zu befruchten. Nach ihrer Passage durch den Nebenhoden werden sie motil, besitzen aber unmittelbar nach der Ejakulation immer noch nicht die Fähigkeit zur Fertilisierung einer Eizelle. Hierfür sind physiologische Veränderungen der Spermien notwendig, die in verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitale vollzogen werden. Diese Notwendigkeit wurde in unabhängigen Arbeiten von CHANG (1951) und AUSTIN (1951) beschrieben und 1952 von AUSTIN als Kapazitation benannt. Die Dauer dieses Vorgangs variiert zwischen den Spezies und ist abhängig vom jeweiligen Besamungstyp. So dauert die Kapazitation beim Schwein als Uterusbesamer ca. zwei Stunden, beim Rind als Vaginalbesamer etwa sechs bis sieben Stunden (CHANG 1951, BEDFORD 1970), wobei dieser Vorgang auch im heterologen Uterus vonstatten gehen kann (YANAGIMACHI und CHANG 1969, SALING und BEDFORD 1981). Die Dauer der Kapazitation hängt dabei nicht von der Umgebung, sondern vom Spermium selbst ab (SALING und BEDFORD 1981).

Um eine optimale, weitgehend zeitunabhängige Fertilisierung zu ermöglichen, verläuft die Kapazitation von Säugetierspermien asynchron. Der Vorteil hierbei besteht darin, dass nicht alle Spermien gleichzeitig kapazitiert werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Befruchtung einer reifen Eizelle erhöht wird (BEDFORD 1983). Diese Bereitstellung kapazitierter Spermien zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglicht eine flexible Anpassung an den Ovulationszeitpunkt (DIDION und GRAVES 1986). Die Kapazitation läuft weitestgehend zyklusunabhängig, wobei allerdings Spermien in einem Uterus unter Progesterondominanz nicht kapazitiert werden, wie CHANG (1958) an Kaninchenspermien zeigen konnte.

BEDFORD (1964) stellte fest, dass selbst elektronenmikroskopisch keine strukturellen Veränderungen an kapazitierten Spermien zu finden sind. Es ist aber davon auszugehen, dass strukturelle Veränderungen, die zu einem Verlust der Membranstabilität führen, mikroskopisch nicht erfaßt werden können. Neuere Untersuchungen zeigen Veränderungen an der Oberflächenstruktur, die in dem Verlust von Glycoproteinen während der Kapazitation bestehen (TAKANO und ABE 2000).

CHANG beschrieb 1957, dass Seminalplasma die Fähigkeit zur Befruchtung, die Motilität und das Eindringen von Spermien in die Zona pellucida hemmt. Dieser Vorgang, den er „Dekapazitation“ nennt, ist reversibel, sobald man dekapazitierte Spermien erneut in den weiblichen Genitaltrakt verbringt. Werden kapazitierte Spermien erneut mit Seminalplasma versetzt, so verlieren sie Ihre Fähigkeit zur Akrosomreaktion. Verantwortlich dafür könnte ein Dekapazitationsfaktor im Seminalplasma sein, der Rezeptoren für Agonisten der Akrosomreaktion maskiert, um damit zu frühe Akrosomreaktionen zu verhindern (BEDFORD 1970). Die Entfernung des Seminalplasma ist also eine wichtige Funktion der Kapazitation.

Eine weitere wesentliche Rolle der Kapazitation besteht in der Bereitstellung verschiedener Membranproteine, welche die Bindung von Spermien an die Zona pellucida ermöglichen sollen. So wird ein 70 kDa großes Protein während der Kapazitation von der äußeren akrosomalen Membran auf die Plasmamembran transferiert (SPUNGIN et al. 1995a) und im Äquatorialbereich des Kopfes wird ein Glycoprotein zugänglich, das ebenfalls der Spermien-Eizell-Erkennung und-Bindung dient (ROSATI et al. 2000).

### 2.1.2 Biochemie der Kapazitation

Proteine des Seminalplasma haben einen positiv-regulatorischen Effekt auf die Kapazitation von Spermien (PARRISH et al. 1988, MILLER et al. 1990). Sie werden während der Ejakulation an die Spermienoberfläche gebunden und interagieren im weiblichen Genitale mit HDL, die in Follikel- und Eileiterflüssigkeit vorkommen (LANGLAIS und ROBERTS 1985, LANGLAIS et al. 1988; EHRENWALD et al. 1990). Dabei vermitteln sie den Austausch von Cholesterin und Phospholipiden zwischen der Plasmamembran und HDL, was zur Abnahme des Cholesterin / Phospholipid-Verhältnisses führt. Letzteres trägt zur Destabilisierung der Membran bei und führt zur Kapazitation (THERIEN et al. 1995). Eine andere Wirkungsweise der Seminalplasmaproteine schlagen PARRISH und FIRST (1991) vor: Die Wechselwirkungen von Seminalplasmaproteinen mit heparinähnlichen Glucosaminoglycanen führen zur Freisetzung von Dekapazitationsfaktoren, welche die Aktivierung von Kationenkanälen modulieren. Dies bewirkt einen Anstieg des  $[pH]_i$  und der  $[Ca^{2+}]_i$ , was über Stimulation von Proteinkinasen oder Hemmung von Phosphodiesterasen einen Anstieg der  $[cAMP]_i$  bewirkt, der schließlich wesentlich zur Kapazitation beitragen soll.

Vielfältig wird die Rolle von Calcium in der Kapazitation diskutiert. YANAGIMACHI (1982) stellt fest, dass die während der Kapazitation auftretende Hypermotilität der Spermatozoen calciumabhängig ist. Diese These wird von BEDFORD 1983 gestützt, indem er nachweist, dass Spermien im Laufe der Kapazitation die Fähigkeit erlangen, auf physiologische Calciumkonzentrationen im weiblichen Genitale zu reagieren. Der Calcium-Influx in Spermien verläuft biphasisch: eine erste Phase mit schwächerem Einstrom dient dem weiteren Verlauf der Kapazitation, eine zweite mit stärkerem Influx führt zu Akrosomreaktion. An der Regulierung dieser Calciumfluxe soll eine Calmodulin-gesteuerte  $Ca^{2+}$ -ATPase beteiligt sein (ADEOYA-OSIGUWA 1993).

Ein früher Schritt in der Kapazitation ist der Efflux von Cholesterin aus der Plasmamembran, wodurch es zu einer Abnahme des Cholesterin-Phospholipidverhältnisses kommt (EHRENWALD et al. 1988). Dies führt zur Bildung fusogener Zonen in der Plasmamembran, wodurch sie destabilisiert wird und sich ihre Permeabilität erhöht (ZANEVELD et al. 1991).

Die Abnahme des Cholesteringehaltes der Plasmamembran steht in Verbindung mit Signaltransduktionsprozessen, die über cAMP als second messenger zu PKA-vermittelten Änderungen in Protein-Tyrosin-Phosphorylierungsmustern und damit zur Kapazitation führen (VISCONTI und KOPF 1998, OSHERHOFF 1999). Diese Prozesse sind abhängig von Carriermolekülen wie Lipoproteinen oder Albumin, die auch in den Sekreten des weiblichen Genitale vorkommen (ZANEVELD et al. 1991). Darüber hinaus hat OSHERHOFF (1999) festgestellt, dass die während der Kapazitation ablaufenden Phosphorylierungen bicarbonatabhängig sind. Nach Untersuchungen von LECLERC (1996) ist außerdem ein verändertes Serin/Threonin-Proteinphosphorylierungsmuster, das durch cAMP-abhängige PKA vermittelt wird, zu beobachten. Letzteres soll die Kapazitation ebenfalls positiv regulieren. Neueren Untersuchungen zufolge stammt das für Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen notwendige ATP aus der Glycolyse im Hauptstück des Spermienschwanzes (TRAVIS et al. 2001).

Während der Kapazitation kommt es durch eine Erhöhung der Permeabilität für  $K^+$ -Ionen zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran. Das Membranpotential steigt dabei von -30 mV bei unkapazitierten auf -50 bis -60 mV bei kapazitierten Spermien. Dadurch wird eine verfrühte Akrosomreaktion unkapazitierter Spermien verhindert. Dies könnte dazu beitragen, dass nur vollständig kapazitierte Spermatozoen auf Stimuli der Zona pellucida reagieren können (ZENG et al. 1995).

Die zur Koordinierung dieser biochemischen Vorgänge erforderlichen Mechanismen sind gegenwärtig nicht vollständig geklärt.

## **2.2 Zona pellucida induzierte Akrosomreaktion**

Die Zona pellucida ist eine extrazelluläre Glycoproteinmatrix, die die unbefruchtete Eizelle vollständig umgibt und von den Follikel- und Cumuluszellen abgrenzt (YANAGIMACHI 1994). Neben einer mechanischen Schutzfunktion dient sie der speziesspezifischen Spermatozoenbindung, der Auslösung der Akrosomreaktion und der Verhinderung einer Mehrfachbefruchtung (BLEIL und WASSARMAN 1980a, NICHOLS und GARDNER 1989, WASSARMAN und ALBERTINI 1994).

### **2.2.1 Struktur und Funktion der Zona pellucida**

In Abhängigkeit von der Spezies besteht die Zona pellucida aus drei bis vier Glycoproteinen. Bei Mensch, Maus und Schwein werden drei Glycoproteine beschrieben (BLEIL und WASSARMAN 1980b und 1983, SHABANOWITZ und O'RAND 1988, YONEZAWA et al. 1995), beim Rind sind vier Glycoproteine am Aufbau der Zona pellucida beteiligt (TOPPER et al. 1997).

Am besten erforscht ist bis heute die Zona pellucida der Maus. Sie besteht aus den Glycoproteinen ZP1, ZP2 und ZP3 (BLEIL und WASSARMAN 1983 und 1980 b, WASSARMAN 1999), die nur von heranwachsenden Oocyten synthetisiert werden (GREVE et al. 1982). ZP2 und ZP3 bilden über nicht kovalente Bindungen lange Filamente aus, die untereinander durch ZP1 quervernetzt sind, wodurch die dreidimensionale Zonamatrix entsteht (GREVE und WASSARMAN 1985, GREEN 1997, WASSARMAN 1999).

ZP3 ist verantwortlich für die speziesspezifische Bindung von Spermien an die Zona pellucida und die Auslösung der Akrosomreaktion (BLEIL und WASSARMAN 1983, SALING 1989, YANAGIMACHI 1994). BLEIL und WASSARMAN (1986) zeigten, dass radioaktiv markiertes ZP3 an die Plasmamembran akrosomintakter Spermien, nicht aber an akrosomreagierte Spermatozoen bindet. Sie schlossen daraus, dass nur Spermien mit intaktem Akrosom an ZP3 binden können. Weiterhin stellten sie fest, dass im Schwanzbereich der Spermien Rezeptoren für ZP3 fehlen.

Als Rezeptor-Domäne für Spermien und zur Auslösung der Akrosomreaktion fungieren O-gekoppelte Oligosaccharide in der C-terminalen Hälfte des Proteins (ROSIERE und WASSARMAN 1992, WASSARMAN und LITSCHER 1995). Für diese Hypothese spricht, dass ein gegen die Polypeptidkette von ZP3 gerichteter monoklonaler Antikörper die Rezeptorfunktion nicht beeinflusst (FLORMAN et al. 1984, FLORMAN und WASSARMAN 1985). Ein weiteres Indiz für die Rolle von ZP3 als Rezeptormolekül und Auslöser der Akrosomreaktion besteht in der Tatsache, dass isoliertes ZP3 die Akrosomreaktion auslöst und die Bindung von Spermien an intakte ZP verhindert. Im Gegensatz dazu haben isoliertes ZP1 und ZP2 weder einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit der Spermatozoen, noch können sie die Akrosomreaktion auslösen (BLEIL und WASSARMAN 1983).

ZP2 hingegen kommt eine wichtige Rolle als sekundärer Spermienrezeptor zu. Dabei bindet es sehr fest an die innere akrosomale Membran akrosomreagerter Spermien, wodurch die Bindung der Spermien an die Zona pellucida verstärkt wird. So behindern polyklonale Antiseren und monoklonale Antikörper gegen ZP2 nicht die initiale Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida. Allerdings verhindern sie die Aufrechterhaltung der Bindung bereits akrosomreagerter Spermien an der Zona pellucida (BLEIL et al. 1988). Einen weiteren Hinweis auf die Bindung von ZP2 an die innere akrosomale Membran liefert die Untersuchung von BLEIL und WASSARMAN (1986). Sie zeigen, dass Anti-ZP2-Antikörper die Bindung von solubilisiertem, radioaktiv markiertem ZP2 an die innere akrosomale Membran akrosomreagerter Spermatozoen herabsetzen. Neuere Untersuchungen an Menschen und Rindern zeigen, dass polyklonale Anti-ZP2-Peptid-Antikörper die Zona-Bindung bei diesen Spezies um 50% herabsetzen. Die unvollständige Hemmung der Bindung deutet darauf hin, dass möglicherweise mehrere unterschiedliche Epitope des ZP2-Proteins für die sekundäre Bindung der Spermien verantwortlich sind (HINSCH et al. 1998).

### 2.2.2 Interaktion der Gameten

Im Zuge der Fertilisierung bei Säugetieren binden Spermien in relativ speziesspezifischer Art und Weise an die Zona pellucida (BLEIL UND WASSARMAN 1983). Seit einigen Jahren werden verschiedene periphere und transmembranäre Proteine der Plasmamembran als Rezeptoren für ZP3 beschrieben, wobei die Interaktion zwischen Proteinen der ZP und Bindungsstellen auf der Spermienoberfläche der Ligand-Rezeptor-Bindung anderer Zellen entspricht.

LEYTON und SALING (1989) wiesen ein 95 kDa großes Protein in der Plasmamembran von Mäusespermien nach, das spezifisch an ZP3 bindet und dadurch aktiviert wird. Das Protein hat die Eigenschaften einer Protein-Tyrosin-Kinase und löst nach seiner Bindung an ZP3 die AR aus, wobei letzteres durch Tyrosin-Kinase-Hemmer verhindert werden kann (LEYTON et al. 1992). Auch bei menschlichen Spermien wird eine Tyrosinkinase als Rezeptorkandidat für ZP3 beschrieben. Dabei handelt es sich um ein membran-integrales, 95 kDa großes, Zona-Rezeptor-Kinase (ZRK) genanntes Protein, das nur in männlichen Keimzellen vorkommt. Nach seiner Bindung an ZP3 entfaltet ZRK intrinsische Aktivität als transmembranärer Signalvermittler und löst die AR aus (BURKS et al. 1995).

Ein weiteres Rezeptormolekül, das bei der Maus die speziesspezifische Bindung von Spermien an ZP3 unbefruchteter Eizellen vermittelt, ist ein 56 kDa großes Protein, welches nur an Köpfen akrosomintakter Spermien nachweisbar ist (BLEIL und WASSARMAN 1990). Dieses Protein wird als sp56 bezeichnet und als peripheres Membranprotein charakterisiert, das an O-gekoppelte Oligosaccharide von ZP3 bindet (CHENG et al. 1994). sp56 ist nur in runden und elongierenden Spermatiden sowie in testikulären Spermien von Maus und Hamster, nicht aber bei Mensch und Meerschwein nachweisbar. Die Expression dieses Proteins gibt deshalb einen Hinweis auf die Speziesspezifität der Spermien-Eizellbindung bei Säugetieren (BOOKBINDER et al. 1995).



HARDY und GARBERS (1995) charakterisieren ein Membranprotein an Schweinespermien, welches sie Zonadhesin nennen. Es weist Homologie zum von Willebrand-Faktor auf und bindet spezifisch an ZP3 porciner Eizellen. Die mRNA und das Protein werden nur in haploiden Spermien nachgewiesen, wodurch die Hypothese gestützt wird, dass dieses Protein spermien-spezifische Funktionen vermittelt. Zonadhesin wird ebenfalls als integrales Membranprotein in Mäusespermien exprimiert. Neben der spezifischen Bindung an murines ZP3 scheint das Protein an weiteren, verschiedenen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt zu sein, worauf weitere extrazelluläre Domänen verschiedener Struktur hindeuten. Des Weiteren ist Zonadhesin ausschließlich in der apikalen Region von Spermienköpfen lokalisiert. Letzteres weist auf seine Funktion als ZP-Rezeptormolekül hin (GAO und GARBERS 1998).

Als weiteres Rezeptormolekül für ZP3 dient eine Splicevariante  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase (GalTase), die auf der Oberfläche von Spermienköpfen vorkommt (SHUR und HALL 1982, LOPEZ und SHUR 1987). Dieses integrale Plasmamembranprotein bindet selektiv an die Oligosaccharide von ZP3, worin sich die strenge Substratspezifität des Spermienenzym wieder spiegelt.  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferasen aus anderen Geweben hingegen erkennen auch extrazelluläre Oligosaccharidreste von ZP1 und ZP 2. Blockiert oder entfernt man die Bindungsstellen für GalTase auf ZP3, so bedingt dies eine verminderte Bindungsfähigkeit von Spermien an ZP3, was die Rolle von GalTase als Rezeptormolekül unterstreicht (MILLER et al. 1992). Untersuchungen am Knock-out-Modell zeigen außerdem, dass Spermien von GalTase-Null-Mäusen weitaus weniger ZP3 binden als Spermien von Wildtypmäusen. Darüber hinaus sind sie nicht in der Lage, eine durch ZP-Glycoproteine ausgelöste AR zu vollführen (LU und SHUR 1997). Nach Bindung von GalTase an ZP3 wird ein G-Protein der  $G_i$ -Familie aktiviert, was schließlich zur Auslösung der AR führt (GONG et al. 1995). Obwohl GalTase am besten an der Maus erforscht ist, zeigen verschiedene Autoren ihre Expression in Spermatozoen zahlreicher anderer Säugetierspezies. FAYRER-HOSKEN et al. (1991) arbeiteten Vorkommen und Rezeptorfunktion von GalTase bei Spermien von Pferd und Rind heraus, LARSON und MILLER (1997) untersuchten systematisch Meerschwein, Maus, Ratte, Rind, Schwein und Kaninchen, wobei GalTase bei allen Spezies in der Plasmamembran nachgewiesen wurde.

Das Zusammenspiel von ZP3 und GalTase scheint also bei vielen Säugetierspezies eine entscheidende Rolle bei der Interaktion der Gameten zu spielen (LARSON und MILLER 1997).

Die Beobachtung, dass Mäusespermien schlecht an Meerschwein- aber sehr gut an Hamstereizellen binden, zeigt, dass die Speziesspezifität der Spermien-Eizell-Bindung nicht absolut ist (MOLLER et al. 1990). In Fällen, in denen die Speziesspezifität gering ist, sind die Rezeptoren für ZP3 vermutlich eng verwandt oder identisch. In Fällen mit hoher Spezifität können trotzdem die selben Rezeptoren die Bindung der Gameten vermitteln. Es ist dabei möglich, dass veränderte Aminosäuresequenzen von z.B. GalTase die Bindungsspezifitäten bedingen (LARSON und MILLER 1997).

Zusätzliche Mechanismen der spezies-spezifischen Fertilisation könnten auf der Ebene der Gametenfusion existieren: Seit neuerem wird auch die Rolle von Fertilin- $\alpha$  und - $\beta$  bei der Spermien-Eizell- Erkennung diskutiert (EVANS et al. 1998). Einen Hinweis darauf geben Untersuchungen an Mäusespermien, die kein Fertilin- $\beta$  exprimieren. Sie sind in ihrer Fähigkeit, an die Zona pellucida zu binden und nachfolgend mit der Eizelle zu fusionieren, eingeschränkt (CHO et al. 1998).

Nach Bindung an die Zona pellucida und die nachfolgende AR kann das Spermium die Zona und den perivitellinen Raum überwinden, bevor es schließlich mit der Äquatorialregion des Kopfes an die Eizellmembran bindet (YANAGIMACHI 1994). Nachdem der Kopf des Spermiums in die Eizelle eingedrungen ist, kommt es zur Kortikalreaktion, die eine Polyspermie verhindert (WASSARMAN 1987). Aktivierung der Oozyte und Kortikalreaktion führen zu einer Modifikation von ZP3 zu ZP3f, wobei letzteres weder an Spermien binden noch die AR auslösen kann (BLEIL und WASSARMAN 1980a)

MILLER et al. (1992) konnten zeigen, dass die Zona pellucida befruchteter Eizellen nicht mehr als Substrat für GalTase dient. Da GalTase N-Acetylglucosaminreste an ZP3 zur Bindung benötigt und die Kortikalgranula einiger Spezies N-Acetylglucosaminidase enthalten, könnte die Freisetzung dieses Enzyms ZP3 durch Entfernung der Bindungsstellen für GalTase inaktivieren und damit zum Polyspermieblock beitragen.

### 2.2.3 Akrosom und Akrosomreaktion

Das Akrosom ist ein sekretorisches Vesikel, das sich vom Golgiapparat reifender Spermatiden ableitet und den Zellkern in der apikalen Region des Spermienkopfes umgibt (FAWCETT 1970, SANDOZ 1970, EDDY und O' BRIEN 1994). Das Akrosom besteht aus zwei Membranen: Von außen nach innen betrachtet liegt die äußere akrosomale Membran (OAM) unter der Plasmamembran und die innere (IAM) über der Kernmembran des Spermiums. Zwischen den beiden akrosomalen Membranen befindet sich die akrosomale Matrix (Wassarman 1999). Morphologisch handelt es sich bei der Akrosomreaktion um die Fusion der OAM mit der Plasmamembran im vorderen Bereich des Spermienkopfes unter Bildung zahlreicher Hybridvesikel. Dieser Vorgang entspricht einer Exozytose, wobei der akrosomale Inhalt freigesetzt wird (SHAPIRO und EDDY 1980, CARDULLO und FLORMAN 1993). Die IAM über dem Zellkern des Spermiums bleibt erhalten und wird durch die AR zugänglich für weitere Schritte der Fertilisierung (YANAGIMACHI 1994). Im Unterschied zu anderen exozytotischen Vorgängen läuft die AR sehr langsam und innerhalb einer Spermienpopulation asynchron ab, wobei zwischen der Stimulation der AR und der Membranfusion mehrere Minuten vergehen können (TALBOT et al. 1976).

Unmittelbar nach der Induktion der AR kommt es durch Neuverteilung von Glykoproteinen zur Bildung glykoproteinfreier Bereiche in der OAM. In diesen Bereichen kommt es zur Fusion der OAM mit der Plasmamembran. Die Fusion schreitet beginnend am Übergang vom äquatorialen zum vorderen Akrosomabschnitt fort (AGUAS und PINTO da SILVA 1985).

Aus der akrosomalen Matrix werden im Zuge der AR verschiedene akrosomale Enzyme freigesetzt, wobei Hyaluronidase und Acrosin für die Zona-Penetration von bedeutender Rolle sind. Hyaluronidase aus der löslichen Fraktion des Akrosoms wird während der AR an die Umgebung abgegeben. Sie unterstützt die Penetration der Cumuluszellschicht, deren Matrix aus Hyaluronsäure besteht (HARRISON 1983).

Acrosin als Hauptbestandteil des Akrosoms ist eine Serinprotease, die aus einer leichten und einer schweren Polypeptidkette besteht, welche untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind (FOCK-NÜZEL et al. 1984). SCHILL und WOLFF (1974) konnten zeigen, dass Acrosin mit der inneren Akrosommembran assoziiert ist. Im intakten Spermium liegt Acrosin in inaktiver Form als das Zymogen „Proacrosin“ vor (MEIZEL und MUKERJI 1975), das während der AR aktiviert wird (KENNEDY und POLAKOSKI 1981). TÖPFER-PETERSEN und CECHOVA (1990) wiesen nach, dass die Zona pellucida verantwortlich für die Umwandlung von Proacrosin in Acrosin ist. Neben einer Beteiligung an der Spermien-Zona-Bindung (SALING 1981) ermöglicht Acrosin die Penetration der Zona pellucida durch limitierte Proteolyse ihrer Glykoproteine, ohne dass dabei die extrazelluläre Matrix aufgelöst wird (DUNBAR et al. 1985).

Während ZP1 und ZP2 durch Acrosin proteolytisch abgebaut werden, scheint ZP3 nicht als Substrat zu fungieren. Der Abbau von ZP1 und ZP2 bewirkt eine Neuordnung dieser Proteine, die auf der Bildung von Disulfidbrücken zwischen den veränderten ZP-Proteinen beruht. Dies soll zur Härtung der Zona und damit zum Polyspermieblock beitragen (NAKANO et al. 1989).

Neuere Untersuchungen zweifeln die tragende Rolle von Acrosin bei der Penetration der Zona pellucida an. BABA et al. (1994) wiesen nach, dass Spermien von Acrosindefizienten Mäusen in der Lage sind, die Zona zu penetrieren und nachfolgend Eizellen zu befruchten. Vielmehr soll Acrosin im Rahmen der AR verantwortlich für die Freisetzung und schnelle Verteilung des akrosomalen Inhaltes sein (YAMAGATA et al. 1998). Diese Entdeckungen führten zu der Annahme, dass neben Acrosin noch andere trypsinähnliche Proteasen für das Durchdringen der Zona pellucida notwendig sind. OHMURA (1999) zeigte, dass das Akrosom ein Pankreas-Trypsin-homologes Protein enthält, das bei der AR freigesetzt wird und beim Durchdringen der Zona eine Rolle spielt. Das als TESP4 bezeichnete Enzym wird von Rundzellen und reifenden Spermatiden bei Affe, Schwein, Hund, Katze, Maus, Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen und Goldhamster exprimiert. TESP4 kommt allerdings weit verbreitet, vor allem im Pankreas, vor.

### 2.2.4 Rolle von G-Proteinen in der Zona pellucida-induzierten Akrosomreaktion

G-Proteine sind Heterotrimere, die aus je einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit zusammengesetzt sind. Der Primärsequenzhomologie der  $\alpha$ -Untereinheiten folgend, werden sie in vier Familien aufgeteilt:  $G_S$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$  (SIMON et al. 1991).  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten sind eng assoziiert und stellen ein funktionelles Monomer dar. Aktivierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) katalysieren den GDP/GTP-Austausch, der eine Dissoziation des Heterotrimers in eine GTP-bindende  $\alpha$ -Untereinheit und ein  $\beta\gamma$ -Dimer nach sich zieht. Sowohl  $G\alpha$ -GTP als auch  $G\beta\gamma$  sind Signalmoleküle, welche die Aktivität vieler Effektorsysteme regulieren (BIRNBAUMER 1992, CLAPHAM und NEER 1993, NEER 1995).

Die Strukturen von GPCRs weisen ein prinzipiell gleiches Bauprinzip auf: Alle Rezeptoren sind integrale Membranproteine, die durch sieben hydrophobe, 20-25 Aminosäuren lange Abschnitte in der Plasmamembran verankert sind. Sie werden deshalb auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet. Diese  $\alpha$ -helikalen transmembranären Domänen werden durch jeweils drei alternierende extrazelluläre und intrazelluläre Peptidschleifen miteinander verbunden (BALDWIN 1993). Der N-Terminus dieser Rezeptoren ragt in den Extrazellulärraum, der C-Terminus befindet sich intrazellulär.

Agonist-Bindung an einen GPCR führt zur Aktivierung von G-Proteinen, die als Signalverstärker fungieren. Anschließend steuern G-Proteine die Aktivität von Effektoren wie Enzymen, Ionenkanälen und Transportern, wobei es zur schnellen Konzentrationsänderung intrazellulärer "second messenger" (z.B. cAMP, Inositolphosphate, Diacylglycerol, Arachidonsäure, intrazelluläre freie Ionen) kommt (BIRNBAUMER et al. 1990, NEER 1995).

Auch Spermienfunktionen wie Motilität, Kapazitation und Akrosomreaktion werden durch second messenger reguliert. Es handelt sich dabei im wesentlichen um  $\text{Ca}^{2+}$  und cyclische Nucleotide wie cAMP, welche die Reaktion von Spermien auf Eizell-assoziierte Stimuli vermitteln (GARBERS und KOPF 1980). Die Antwort des Spermiums auf extrazelluläre Reize läuft dabei nach Art einer Hormon-Rezeptor-Effektor-Interaktion in somatischen Zellen ab (KOPF et al. 1986). Als Schaltstellen zwischen extrazellulären Stimuli und intrazellulären Effektorsystemen wurden von verschiedenen Autoren G-Proteine der  $G_i$ -Familie herausgearbeitet.

KOPF et al. (1986) und BENTLEY et al. (1986) wiesen immunhistochemisch  $\beta$ -Untereinheiten von G-Proteinen in Spermien nach und zeigten in unabhängigen Versuchen die Anwesenheit von  $\alpha$ -Untereinheiten, indem sie ein 41 kDa großes, durch Pertussistoxin (PTX) ribosylierbares Substrat nachwiesen. Ausgehend von der Tatsache, dass PTX nur  $G_i$ -Proteine durch ADP-Ribosylierung ihrer  $\alpha$ -Untereinheit funktionell inaktiviert (GILMAN 1984), charakterisierten ENDO et al. (1987) ein  $G_i$ -ähnliches Protein in Mäusespermien.  $G_i$  ist das einzige in Spermien bekannte Substrat für die PTX-katalysierte ADP-Ribosylierung (LEE et al. 1992). Dieses Protein wird ebenso in Spermien von Mensch, Schwein und Meerschwein (BENTLEY et al. 1986, LEE et al. 1992) sowie bei der Maus (ENDO et al. 1987) nachgewiesen. Auch beim Rind wird eine Beteiligung von G-Proteinen an der AR angenommen (FLORMAN et al. 1989). Die Lokalisation von  $G\alpha_i$ -Untereinheiten wurde zunächst in der Spitze des Akrosoms von Bullenspermien beschrieben (GARTY et al. 1988). MERLET et al. (1999) zeigten  $G\alpha_i$ -Untereinheiten in Akrosom, Mittelstück und Schwanz von humanen Spermatozoen. Diese Lokalisierung von  $G_i$ -Proteinen an unterschiedlichen Abschnitten des Spermiums weist darauf hin, dass  $G_i$  an der Signaltransduktion verschiedener Ereignisse wie Induktion der AR, Motilität und Fusion mit der Oocyte beteiligt sein könnte (MERLET et al. 1999).

Die funktionelle Inaktivierung von  $G_i$  in Spermien durch PTX hemmt die Zona pellucida-induzierte Akrosomreaktion, was einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung von G-Proteinen an der Signaltransduktion der Fertilisierung gibt (FLORMAN et al. 1989, ENDO et al. 1988, LEE et al. 1992, LECLERC und KOPF 1999, SHI et al. 2001). ENDO et al. (1988) stützen diese Hypothese, indem sie zeigen, dass sich eine Behandlung von Mäusespermien mit PTX nicht auf die Calciumionophor-induzierte und die spontane Akrosomreaktion, wohl aber auf die Zona pellucida-stimulierte AR hemmend auswirkt. Sie schlossen außerdem daraus, dass  $G_i$  in Spermien nur durch einen physiologisch relevanten Agonisten aktiviert werden kann. Die Zona pellucida der Maus aktiviert selektiv  $G_{i1}$  und  $G_{i2}$  in Mäusespermien, was nachfolgend zur Akrosomreaktion führt (WARD et al. 1994). Auch dieser Vorgang ist durch PTX hemmbar, indem  $G_{\alpha i1}$  und  $G_{\alpha i2}$  durch ADP-Ribosylierung inaktiviert werden (WARD et al. 1994).

Ausgehend von der Tatsache, dass bei der Spermien-Eizell-Interaktion eine Vielzahl von Rezeptoren eine Rolle spielen, gibt doch die selektive Aktivierung von  $G_{i1}$  und  $G_{i2}$  einen Hinweis darauf, dass zumindest ein ZP3-Rezeptor einem GPCR funktionell entsprechen könnte (NING et al. 1995). Ein atypischer GPCR scheint  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase in der apikalen Region des Akrosoms zu sein. Dieses Enzym aktiviert nach seiner Stimulierung durch ZP3 PTX-sensitive G-Proteine, die die akrosomale Exocytose auslösen (GONG et al. 1995, SHI et al. 2001).

Welche Effektoren und second messenger Systeme durch G-Proteine in Spermien angesteuert werden, ist noch nicht geklärt. Allerdings zeigten FLORMAN et al. (1989), dass GTPasen eine Agonist-induzierte Erhöhung von  $[pH]_i$  und  $[Ca^{2+}]_i$  vermitteln und dadurch die Akrosomreaktion regulieren. Neueren Untersuchungen zufolge wird die Adenylylcyclase in Mäusespermien von der Zona pellucida über einen PTX-sensitiven G-Protein-gekoppelten Signalweg aktiviert. Der daraus resultierende Anstieg von  $[cAMP]_i$  stellt neben der Erhöhung von  $[pH]_i$  und  $[Ca^{2+}]_i$  eine der wichtigsten Zona pellucida induzierten Veränderungen hinsichtlich der Auslösung der AR dar (LECLERC und KOPF 1999).

### 2.2.5 Biochemie der Akrosomreaktion

Für die Fusion der äußeren Plasmamembran mit der darüberliegenden Plasmamembran und die nachfolgende akrosomale Exocytose ist ein Influx von Calciumionen aus dem extrazellulären Raum einer der wichtigsten Faktoren. Dabei sind *in vitro* Konzentrationen von mindestens 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$  im Inkubationsmedium notwendig (YANAGIMACHI und USUI 1974, YANAGIMACHI 1982, 1994). YANAGIMACHI und USUI (1974) zeigten, dass die AR in kapazitierten Meerschweinspermatozoen allein durch Calciumionen ausgelöst werden kann. Die Tatsache, dass nur kapazitierte Spermien die AR in Gegenwart von Calcium vollführen, begründen die Autoren mit der Hypothese, dass während der Kapazitation maskierende Substanzen von der Spermienoberfläche entfernt werden, was  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen und/oder Carriermoleküle zugänglich macht.

Nach Bindung des Spermiums an die Zona pellucida findet der Calciumeinstrom in zwei Phasen statt, wobei ein erster schwacher Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bereits während der Kapazitation zu verzeichnen ist. Ein zweiter starker Anstieg löst schließlich die AR aus (ADEOYA-OSIGUWA und FRASER 1993). Solublilisierte ZP induziert einen schnellen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , dessen Maximum ca. 40 s anhält und nach drei bis fünf Minuten wieder auf Basalwerte zurückfällt. Der initiale Anstieg beginnt in der Äquatorialregion des Kopfes und dehnt sich innerhalb von 0,6 s über die postakrosomale Region aus. Die Calciumkonzentration in der postakrosomalen Region bleibt zunächst erhöht, wohingegen sie im Akrosom plötzlich infolge der einsetzenden AR wieder abfällt (SHIRAKAWA und SHUNICHI 1999).



Die Aktivierung von nicht-selektiven Calciumkanälen stellt den entscheidenden ersten Schritt des Zona pellucida-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$  Einstroms dar (ARNOULT et al. 1996a). BRANDELLI et al. (1996) beschrieben ein Zusammenspiel von PTX-sensitiven  $\text{G}_i$ -Proteinen, Membranpotential sowie Veränderungen des  $[\text{pH}]_i$  bei der Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle durch die Zona pellucida. Während der Kapazitation kommt es durch erhöhte  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit zur Hyperpolarisation, wobei das Membranpotential auf bis zu  $-60$  mV ansteigt (ZENG et al. 1995). Dadurch sollen verfrühte Akrosomreaktionen in unkapazitierten Spermien verhindert werden (ZENG et al. 1995), indem spannungsabhängige Calciumkanäle während der Kapazitation geschlossen bleiben (ARNOULT et al. 1999). Die Bindung an die ZP führt zu einer vorübergehenden Erhöhung des pH-Wertes von etwa 6,6 auf 6,8 bis 7 und zur Depolarisierung der Spermienmembranen, wodurch das Membranpotential von  $-60$  mV auf  $-30$  mV fällt. Daraufhin werden spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet, was in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und schließlich der Auslösung der AR resultiert (ARNOULT et al. 1996b, 1999). Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  steigt dabei von ca. 50 nM in unkapazitierten über 125 nM in kapazitierten auf 300-500 nM in kapazitierten, durch die ZP stimulierten Spermien an (FLORMAN 1994).

Da die Zona pellucida einen starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx induziert, der in Spermien identifizierte T-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal aber aufgrund seiner schnellen Inaktivierung nur kleine transiente Einströme vermitteln kann, schlugen ARNOULT et al. (1996b) folgende Hypothese vor: Der durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ermöglichte Influx von Calciumionen aktiviert eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Freisetzung akrosomaler Calciumspeicher. Tatsächlich zeigen neuere Untersuchungen, dass nicht der Einstrom extrazellulären Calciums allein für die Auslösung der AR verantwortlich ist. Ebenso reguliert eine ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe im Akrosom die Speicherung von Calcium während der Kapazitation in diesem Organell resp. dessen Freisetzung im Zuge der AR (DRAGILEVA et al. 1999, ROSSATO et al. 2001). Eine Erklärung zur Akkumulation von Calcium während der Kapazitation besteht in der Tatsache, dass Phospholipase C, die Phosphatidylinositol zu Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol spaltet, durch die Zona pellucida aktiviert wird (TOMES et al. 1996). Dadurch wird  $\text{IP}_3$  erst unmittelbar vor der Akrosomreaktion gebildet, was einen  $\text{IP}_3$ -angesteuerten akrosomalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal während der Kapazitation in seinem inaktiven Zustand hält.

Dies erlaubt die Speicherung von Calcium durch die akrosomale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und verhindert gleichzeitig die mit dessen Freisetzung einhergehende verfrühte AR (WALENSKY und SNYDER 1995, DRAGILEVA et al. 1999). Weder die Freisetzung aus akrosomalen Speichern noch der Influx von Calcium aus der extrazellulären Matrix allein bewirken einen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , der ausreichend ist, die AR auszulösen. Vielmehr wirken beide über unterschiedliche Calciumkanäle vermittelte Vorgänge, synergistisch (O'TOOLE et al. 2000).

Mehrere second messenger Systeme unter Beteiligung der Proteinkinasen A, C und G sind an der Zona pellucida-induzierten AR beteiligt (BREITBART et al. 1992, BIELFELD et al. 1994, LIU und BAKER 1997). Aktivierte Proteinkinase C kann die Akrosomreaktion unabhängig von Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentration auslösen (ROTEM et al. 1992). Mögliche Rollen dieser Kinase bestehen in der Regulierung von Phospholipase D<sub>1</sub> (GARBI et al. 2000) sowie der Aktivierung eines Calciumkanals in der Plasmamembran (SPUNGIN und BREITBART 1996).

LECLERC und KOPF (1999) zeigten, dass G-Proteine an der Regulierung der Spermien Adenylylcyclase beteiligt sind, und erklären damit den Zona pellucida-induzierten Anstieg von cAMP während der AR. Erhöhte intrazelluläre cAMP Konzentrationen bewirken entweder direkt oder indirekt über die Aktivierung von Proteinkinase A die Freisetzung von Calcium aus akrosomalen Speichern, wobei Proteinkinase A einen Calciumkanal durch dessen Phosphorylierung aktivieren könnte (SPUNGIN UND BREITBART 1996). In der Plasmamembran von Bullenspermien wurde ein durch zyklische Nucleotide angesteuerter Kanal nachgewiesen, der für die Fertilisierung eine entscheidende Rolle spielt (WEYAND et al. 1994).

Während der Kapazitation führt die Polymerisation von Aktin zur schnellen Bildung von Aktinfilamenten, welche an die Plasmamembran und die äußere akrosomale Membran gebunden sind. Hierdurch kommt es zur verstärkten Bindung von Phospholipase C an das membranassoziierte Aktin (SPUNGIN et al. 1995b). Die Aktivierung dieser membrangebundenen Phospholipase führt zur Bildung von DAG und IP<sub>3</sub>. DAG führt zu verstärkter Fusogenität der Membranen (SIEGEL et al. 1989), IP<sub>3</sub> bindet an seinen akrosomalen Rezeptor, dessen Aktivierung zur Freisetzung von Calcium aus dem Akrosom führt (WALENSKY und SNYDER 1995, DRAGILEVA et al. 1999), wodurch die AR vorangetrieben wird.

### **2.3 Andere Induktoren der Akrosomreaktion**

Obwohl generell anerkannt ist, dass die Zona pellucida in vivo die AR auslöst (siehe oben), gibt es Hinweise auf die Beteiligung anderer Faktoren an der akrosomalen Exocytose. So kann die AR durch Prostaglandin E (JOYCE et al. 1987, SCHAEFER et al. 1998), Progesteron (OSMAN et al. 1989, ROLDAN et al. 1994) und Angiotensin II (KÖHN et al. 1998, GUR et al. 1998, SABEUR et al. 2000) initiiert werden.

#### **2.3.1 Prostaglandine**

Metaboliten aus dem Arachidonsäurestoffwechsel von Spermien und des weiblichen Genitale sind in der Lage, die AR auszulösen. Dies gilt für Produkte des Cyclooxygenaseweges und für solche des Lipoxygenaseweges. So zeigten MEIZEL und TURNER (1984), dass PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> und Hydroxyarachidonsäurederivate in hohen Konzentrationen die AR in Hamsterspermien stimulieren können. In kapazitierten Mäuse- und Meerschweinspermien lässt sich die AR durch Zugabe von Cyclooxygenasehemmern wie Phenylbutazon oder Indomethacin hemmen. Dieser Effekt ist reversibel, wird den Spermien eine Mischung aus exogenem PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> zugesetzt. Letzteres spricht für eine Beteiligung dieser Cyclooxygenasemetaboliten an der AR (JOYCE et al. 1987). Dabei induzieren Prostaglandine einen Calciuminflux durch PTX-insensitive Calciumkanäle, was zur Auslösung der AR führt (SCHAEFER et al. 1998, SHIMIZU et al. 1998).

Untersuchungen von SCHAEFER et al. (1998) zeigten, dass die Effekte von PGE<sub>1</sub> in humanen Spermien über einen G<sub>q</sub>/11-gekoppelten Prostanoidrezeptor vermittelt werden. Die Aktivierung dieses Rezeptors führt zum Einstrom von Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> oder Mn<sup>2+</sup> durch denselben Kanal. Diese Tatsache ist ein Indiz dafür, dass PGE<sub>1</sub> eine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch Öffnung eines nicht-selektiven Kationenkanals bewirkt. Im Gegensatz dazu zeigen Eber- und Bullenspermien keine Reaktion auf die Stimulierung mit PGE<sub>1</sub>.

### 2.3.2 Progesteron

Das Steroidhormon Progesteron, das von Follikelzellen ovulierter Eizellen sezerniert wird, verstärkt die Bindung von Spermien an die Zona pellucida und ist in der Lage, die AR auszulösen (OSMAN et al. 1989, CHENG et al. 1998). Werden Mäusespermien zuerst mit Progesteron behandelt und dann mit homologen ZP zusammengebracht, so läuft die Akrosomreaktion effektiver ab, als wenn beide Agonisten gemeinsam oder in umgekehrter Reihenfolge eingesetzt würden. Dieser Befund zeigt, dass Progesteron einen vorbereitenden („priming“) Effekt auf die AR hat (ROLDAN et al. 1994).

In menschlichen Spermien führen 17 $\alpha$ -OH-Progesteron und Progesteron zu einem schnellen Influx von Ca<sup>2+</sup> aus dem Extrazellulärraum und zur Auslösung der AR. Diese Effekte sollen durch Aktivierung eines rezeptorgesteuerten Ca<sup>2+</sup>-Kanals gesteuert werden (BLACKMORE et al. 1990). Der Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> geht mit erhöhter Aktivität der Phospholipase C und der Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> einher (THOMAS und MEIZEL 1989).

Da Antagonisten des genomischen Effekts von Progesteron an Spermien wirkungslos sind, schließen BLACKMORE et al. (1991), dass Progesteron, anders als bei somatischen Zellen, nicht an einen genomischen, sondern an einen Membranrezeptor bindet. Tatsächlich bindet das Steroidhormon mit seiner  $\beta$ -Seite an den Membranrezeptor, während für die Bindung an den intrazellulären Rezeptor die  $\alpha$ -Seite entscheidend ist (BLACKMORE et al. 1996). Welcher Signaltransduktionsweg nach Bindung von Progesteron an seinen Rezeptor schließlich zur Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> führt, ist unbekannt. Während für die Zona-induzierte AR die Beteiligung von G-Proteinen angenommen wird, geben die Vergleiche der Wirksamkeit von PTX auf die ZP-induzierte und die durch

Progesteron ausgelöste AR keine Hinweise auf eine Beteiligung von G-Proteinen an der Progesteron-vermittelten AR, da die zelluläre Antwort auf Progesteron nach PTX-Behandlung unverändert bleibt (TESARIK et al. 1993).

### 2.3.3 Angiotensin Converting Enzyme / Angiotensin II

Eine Rolle des Angiotensin Converting Enzyme an der Induktion der Akrosomreaktion wird seit einiger Zeit untersucht. FORESTA et al. (1991) zeigten, dass die Frequenz der AR und die Zahl von Hamsterspermien, welche mit zonafreien Oocyten fusioniert waren, nach Hemmung von ACE durch Captopril deutlich abnimmt. Bei ejakulierten menschlichen Spermatozoen ist ACE auf der Plasmamembran in der akrosomalen Region nachweisbar (KÖHN et al. 1998). Nach KÖHN et al. (1998) ist nicht ACE selber, sondern vielmehr Angiotensin II, das durch Abspaltung eines C-terminalen Dipeptids aus Angiotensin I durch ACE entsteht, für die pharmakologische Wirkung im Zuge der AR verantwortlich. Während ACE zwar bei humanen und bovinen Spermien die Bindung an die Zona pellucida verstärkt, kann Angiotensin II die AR auslösen, wohingegen Angiotensin I ohne Wirkung ist (KÖHN et al. 1998, GUR et al. 1998).

Seine Wirkung entfaltet Angiotensin II bei Bullen- und Hengstspermien über G-Protein-gekoppelte AT<sub>1</sub>-Rezeptoren, die in der postakrosomalen Region, dem Äquatoralsegment und dem vorderen Teil der Schwanzes kapazitierter Spermien lokalisiert sind. Sowohl beim Rind als auch beim Pferd kommt es nach Aktivierung der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren zu einem starken Calciuminflux, der die AR auslöst (GUR et al. 1998, SABEUR et al. 2000). AT<sub>2</sub>-Rezeptoren scheinen für die Angiotensin II-induzierte AR in menschlichen Spermien verantwortlich zu sein (KÖHN et al. 1998). Diese Rezeptoren sind G-Protein-unabhängig (VINSON et al. 1997) und sollen die AR über die Aktivierung der Proteinkinasen A und C sowie eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  steuern (KÖHN et al. 1998).

## 2.4 Pertussistoxin als zellbiologisches Werkzeug

YAJIMA et al. (1978a, b) isolierten ein Protein aus *Bordetella pertussis*, das sie „islets-activating protein“ (IAP) nennen, da es über die Aktivierung der Inselzellen die Insulininkretion bei Ratten verstärkt. Es handelt sich um ein 105 kDa großes hexameres Enzym, welches aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist: Die enzymatisch aktive A-Untereinheit besteht aus einem einzigen Polypeptid, die B-Untereinheit ist ein pentameres Oligopeptid (TAMURA et al. 1982), das der Bindung des Toxins und dessen Transport durch die Plasmamembran dient (UI et al. 1985). In der Zelle wird die A-Untereinheit unter reduzierenden Bedingungen Glutathion-abhängig aktiviert und katalysiert die Hydrolyse von  $\text{NAD}^+$  und den Transfer des ADP-Anteils auf einen Cysteinrest nahe des C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit von  $G_i$ -Proteinen (GILMAN 1984). Die ADP-Ribosylierung der  $G_{\alpha i}$ -Untereinheit führt durch Entkopplung des  $G_i$ -Proteins von seinem transmembranären Rezeptor zur funktionellen Inaktivierung des Proteins (GILMAN 1984, UI et al. 1985, FREISSMUTH et al. 1989). Dieser Vorgang kann nur unter der Voraussetzung stattfinden, dass  $G_{\alpha i}$  in der inaktiven heterotrimeren  $\alpha\beta\gamma$ -Komplexform des G-Proteins vorliegt (HUFF und NEER 1986).

Das Prinzip der ADP-Ribosylierung erlaubt Nachweis und Identifikation von GTPasen sowie die Untersuchung ihrer physiologischen Rolle in GPCR-vermittelten Signaltransduktionskaskaden zahlreicher Zellsysteme (MILLIGAN 1988). So führte der Einsatz von PTX zur Entdeckung von  $G_i$ -Proteinen in Spermien von Intervertebraten- und Säugetierspermien verschiedener Spezies (KOPF et al. 1986, BENTLEY et al. 1986, FLORMAN et al. 1989, LEE et al. 1992). Von manchen Zellsystemen ist bekannt, dass deren  $G_i$ -Proteine PTX-insensitiv sind. So werden  $G_i$ -Proteine in Sf9-Insektenzellen nicht durch PTX ADP-ribosyliert (MULHERON et al. 1994). In Thrombozyten ist PTX ebenfalls unwirksam, da es nicht in die Zellen eindringen kann. Das liegt vermutlich an der mangelhaften Expression von Bindungsstellen für die B-Untereinheit des Toxins oder am Unvermögen der Thrombozyten, gebundenes PTX zu internalisieren (BRASS et al. 1990).

Zur Überprüfung der Modifikation von  $G_i$ -Proteinen nach Behandlung mit PTX können funktionelle Tests angewandt werden. So kann die Hemmung eines

bestimmten zellulären Signals nach Stimulierung durch einen bestimmten G<sub>i</sub>-Proteinaktivator aufgezeichnet werden: In HL-60 Zellen, deren G-Protein-Ausstattung größtenteils aus PTX-sensitiven G<sub>i</sub>-Proteinen besteht (KLINKER et al. 1996), führt die Stimulierung dieser GTPasen mit fMLP normalerweise zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  und einer Erhöhung der GTPase-Aktivität. Nach Inkubation der Zellen mit PTX sind diese Phänomene gehemmt (HAGELÜKEN et al. 1995). SCHAEFER et al. (1998) zeigten an menschlichen Spermien, dass Mastoparan, ein spezifischer Aktivator von G<sub>i/o</sub>-Proteinen (HIGASHIJIMA et al. 1988, 1990), die Akrosomreaktion auslösen kann, wobei dieser Effekt nicht durch Vorbehandlung der Spermien mit 1 µg/ml PTX hemmbar ist.

Die zur Untersuchung von G-Proteinen eingesetzten Konzentrationen von PTX im Inkubationsmedium variieren je nach Autor von 25 ng / ml (BENTLEY et al. 1986) bis zu 20 µg / ml (WARD et al 1994). Die Inkubation von Spermien mit PTX hat auch bei Konzentrationen von 1 µg / ml (FLORMAN et al. 1989) resp. 20 µg / ml (WARD et al. 1994) keinen negativen Einfluss auf ihre Vitalität.