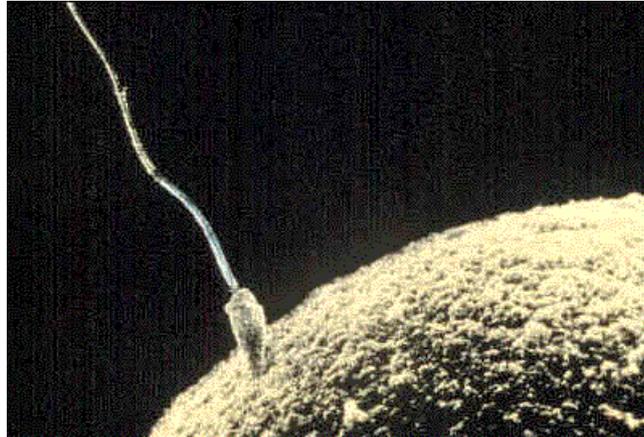


Untersuchungen zu Signaltransduktionsmechanismen in humanen Spermien



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Birthe Willipinski-Stapelfeldt
aus Bad Segeberg (SH)

Hamburg 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. J. OLCESE

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. Bretting

Tag der Disputation: 14. Juni 2002

Hamburg, den 01. Juni 2002



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt

Sir Isaac Newton (1643-1727)

1. EINLEITUNG	1
1.1 Aufbau des Hodens	1
1.2 Spermatogenese und Spermiogenese	2
1.3 Reifung der Spermien im Nebenhoden und Ejakulation	5
1.4 Auf dem Weg zur Eizelle	6
1.5 Befruchtung der reifen Oozyte	10
1.6 Die etablierten Regulatoren der Spermienmotilität	13
1.6.1 Adenylatzyklase	13
1.6.2 Guanylatzyklase	15
1.7 Die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3), ein weiterer möglicher Regulator von Spermienfunktionen	19
1.8 Die Rolle von Zink bei Motilität und Fertilität der Spermien	20
1.9 Zielsetzung der Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Herkunft der Spermien	23
2.2 Reinigung der Spermien („Swim-Up“)	23
2.3 Kultivierung von MA-10 – Zellen	24
2.4 Herstellung von Homogenaten	25
2.5 Gewinnung von partikulären- und Cytosolfractionen	26
2.6 Proteinbestimmung	26
2.7 SDS-PAGE (1-dimensionale Gelelektrophorese)	27
2.8 Western-Blot	28
2.8.1 Ponceau-Färbung der Blots	31
2.9 Enzym Assays	32
2.9.1 Adenylatzyklase-Assay	32
2.9.2 Guanylatzyklase-Assay	33
2.10 Bestimmung der cAMP- und cGMP-Konzentrationen	33
2.10.1 cAMP-ELISA und cGMP-ELISA mit Acetylierung	33
2.10.2 cAMP-FIA	37
2.10.3 cGMP-ELISA	40
2.11 Proteomics	41
2.11.1 Isoelektrische Fokussierung	41
2.11.2 2. Dimension (SDS-PAGE)	43
2.11.3 Alkalische Silberfärbung	45
2.11.4 MALDI-kompatible Silberfärbung	46

2.11.5 Picken der Spots.....	47
3. ERGEBNISSE.....	48
3.1 Untersuchungen zur Adenylatzyklase-Aktivität.....	48
3.2 Untersuchungen zur Guanylatzyklase-Aktivität.....	53
3.3 Untersuchungen zur Tyrosinphosphorylierung der Proteine in humanen Spermien.....	57
3.3.1 Einfluss von cAMP und cGMP auf die Tyrosinphosphorylierung in humanen Spermien.....	57
3.3.2 Einfluss von Zink auf die Tyrosinphosphorylierung in humanen Spermien.....	58
3.4 Untersuchungen zur GSK-3.....	61
3.4.1 Untersuchungen zu Regulatoren der GSK-3.....	61
3.4.2 Untersuchungen zu Zielproteinen der GSK-3 in humanen Spermien.....	62
3.4.3 Untersuchungen zu Regulatoren der GSK-3.....	65
3.4.4 Untersuchungen zu Zielproteinen der GSK-3.....	69
3.5 Proteomics.....	70
3.5.1 Unterschiede der Proteinexpression in Swim-Up und Bottom-Fraktion.....	70
3.5.2 Unterschiede in der Proteinexpression zwischen cytosolischer und partikulärer Fraktion humaner Spermien.....	73
3.5.3 Unterschiedliche Darstellung des Spermien-Proteoms durch verschiedene pH-Gradienten.....	74
3.5.4 Unterschiede in der Proteinexpression nach Inkubation mit 8-Br-cAMP und Zink.....	76
3.5.5 Phosphotyrosin-Immunoblot nach vorheriger 2-dimensionaler Elektrophorese.....	78
3.5.6 Identifizierung einzelner Proteine nach 2-dimensionaler Elektrophorese und anschließender Silberfärbung.....	80
4. DISKUSSION.....	85
4.1 Adenylatzyklase- und Guanylatzyklase-Aktivität.....	85
4.2 Tyrosinphosphorylierung.....	87
4.3 GSK-3 in Spermien.....	89
4.4 Proteomics.....	96
5. LITERATUR.....	100
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS/ GLOSSAR.....	120
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	120

6.2 Glossar.....	122
DANKSAGUNG.....	123
LEBENS LAUF.....	125

I. Zusammenfassung

Da Spermien keine Transkriptions- und Translationsaktivität aufweisen, können nur Signaltransduktionsmechanismen, welche auf posttranslationalen Modifikationen wie z.B. reversibler Proteinphosphorylierung beruhen, die Spermienfunktionen beeinflussen. In Spermien vieler Spezies konnte cAMP als Regulator oder Mitregulator von Motilität, Kapazitation und Akrosomenreaktion dokumentiert werden, obwohl die zellulären Mechanismen, die an der Kontrolle der cAMP-Spiegel beteiligt sind und für die Aktivierung oder Inhibierung von Zielproteinen verantwortlich sind, bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Über eine Rolle von cGMP für die Regulation von Spermienfunktionen bei Säugetieren sind hingegen bisher kaum Daten vorhanden, obgleich dieser Botenstoff z.B. bei marinen Invertebraten wesentlichen Einfluss auf Spermien-assoziierte Prozesse hat. In dieser Arbeit ist es gelungen, bisher noch nicht bekannte Signalmoleküle und -wege in humanen Spermien zu identifizieren. Diese wurden sowohl mit Hilfe des Immunoblottings, von Enzym-Assays und ELISAs als auch der 2-dimensionalen Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung und massenspektrometrischer Identifizierung per MALDI-TOF untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zink, das im Seminalplasma in hohen Konzentrationen bis zu 2 mM vorkommt, die Adenylatzyklase-Aktivität in Spermien zeit- und konzentrationsabhängig aktiviert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Zink die Tyrosinphosphorylierung, welche ein essentielles Ereignis während der Kapazitation darstellt, in gleichem Maße wie cAMP induzieren kann. Dieser Effekt ist ebenfalls zeit- und konzentrationsabhängig und kann durch den Proteinkinase A (PKA) -Inhibitor H-89 blockiert werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Zink in der Lage ist, wichtige Funktionen für die Regulation der Motilität positiv zu beeinflussen. Ein in humanen Spermien neues Signalmolekül ist auch die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3), welche durch Zink und cAMP an Serinresten phosphoryliert und somit inaktiviert wird. Die GSK-3 α -Ser phosphorylierte Isoform des Enzyms ist dabei in motilen Spermien stärker exprimiert als in immotilen, was sowohl auf eine Rolle der GSK-3 als wiederum auch von Zink bei der Regulation der Spermienmotilität schließen lässt. Die cAMP-induzierte Deaktivierung der GSK-3 kann durch den PKA-Inhibitor H-89 inhibiert werden, was für eine Rolle der PKA spricht. Der Effekt von Zink auf die GSK-3 ist jedoch nicht PKA vermittelt, da der

PKA-Inhibitor H-89 keinen Effekt auf die Inaktivierung der GSK-3 durch Zink hat. Weitere Untersuchungen sollten Aufschluß über andere mögliche Signalwege geben. GSK-3 ist das erste entdeckte Substrat der PKB/Akt (Proteinkinase B). PKB/Akt ist in humanen Spermien im Gegensatz zu humanem Hoden und Rattenhoden jedoch nicht per Western Blot nachweisbar. Es wurde aber ein anderer potentieller Regulator der GSK-3 per Western Blot nachgewiesen, die Integrin-Linked Kinase (ILK), welche mit Integrinen an der Spermienmembran interagieren kann. Ein weiteres Enzym, welches regulatorisch auf die GSK-3 wirken kann, ist die Protein Phosphatase 2A (PP2A). Auch hier konnte eine unterschiedliche Verteilung der beiden regulatorischen Untereinheiten PP2A/A und PP2A/B α in motilen und immotilen Spermien gezeigt werden. Ein weiteres potentielles Zielprotein, welches sowohl mit der GSK-3 als auch mit der PP2A interagieren kann, ist β -Catenin. Dieses war in humanen Spermien im Gegensatz zur Kontrolle humaner cerebraler Cortex nicht per Immunoblot nachzuweisen.

In dieser Arbeit konnte neben einer Aktivität der Adenylatzyklase auch eine Aktivität der Guanylatzyklase in humanen Spermien nachgewiesen werden. Doch obwohl eine Aktivität der partikulären Guanylatzyklase in humanen Spermien nachgewiesen werden konnte, ist diese durch keinen der drei bekannten Aktivatoren, allesamt natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP), aktivierbar. Auch Zink hat keinen Einfluss auf die Aktivität. SNP hingegen, ein NO-Donor, konnte die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase aktivieren.

Eine weitere Möglichkeit, für Motilität wichtige Moleküle zu identifizieren, ist, das Proteom von Spermien zu untersuchen. Dazu wurde die Technik der 2D-Elektrophorese mit anschließender Silberfärbung und massenspektrometrischer Analyse angewandt. Mit Hilfe dieser Methode ist es gelungen, Unterschiede in der Proteinexpression zwischen motilen und immotilen Spermien aufzuzeigen.

3 Proteine humaner Spermien konnten mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden: Human Serum Albumin Precursor, Keratin I und RNA Binding Protein Regulatory Subunit, wobei die ersten beiden deutlich stärker in motilen Spermien exprimiert werden und bei Stimulation mit 8-Br-cAMP und Zink sogar noch deutlich aufreguliert werden.

1. Einleitung

Die Chance der Frau, pro Monatszyklus schwanger zu werden, beträgt auch unter besten Bedingungen nicht mehr als 30%. In den westlichen Industrienationen sind ca. 15% aller Ehepaare ungewollt kinderlos. In 40% dieser Fälle liegt die Ursache beim Mann. Neben unzureichender Spermienbildung und gestörtem Spermientransport ist eine der häufigsten Ursachen die Immotilität der Spermien. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zu Signaltransduktionsmechanismen in humanen Spermien beschränken sich auf neue, mit der Motilität in Zusammenhang stehende Signalwege.

1.1 Aufbau des Hodens

Der Hoden ist die männliche Keimdrüse, in der neben den Geschlechtshormonen auch die männlichen Keimzellen, die Spermien, gebildet werden. Der Aufbau des Hodens gliedert sich in zwei Kompartimente, das Interstitium und die Tubuli seminiferi, in denen die Spermatogenese stattfindet (Abb.1). Die Tubuli seminiferi machen nahezu 90% des Hodenvolumens aus. Der Hoden ist außen umgeben von einer Bindegewebshülle (Tunica). Das Interstitium enthält Leydigzellen, die das männliche Geschlechtshormon Testosteron bilden, Blutgefäße, Lymphgefäße, Makrophagen, Mesenchymzellen sowie kontraktile peritubuläre Myoidzellen, die an der Bewegung des Fluids und der Spermien durch die Tubuli beteiligt sind. Die Tubuli seminiferi enthalten die Sertolizellen, welche die sich entwickelnden Keimzellen umhüllen und Proteine wie das Androgen-Binding Protein, Plasminogen-Aktivator und Fibroblast Growth Factor sezernieren, die die Spermatogenese unterstützen.

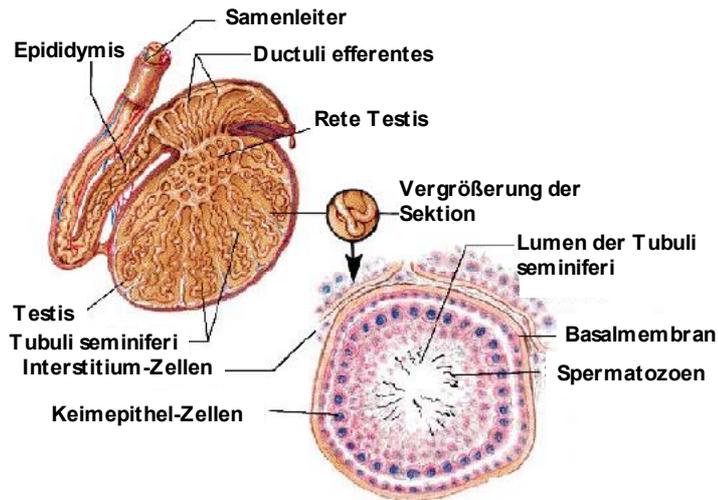


Abb.1 Schematische Darstellung des menschlichen Hodens.

1.2 Spermatogenese und Spermio-genese

Die Spermatogenese kann formal in drei Phasen unterteilt werden: Die proliferative Phase, die meiotische Phase und die Spermio-genese, in der die haploiden runden Spermatoziden zu reifen Spermatozoen differenzieren.

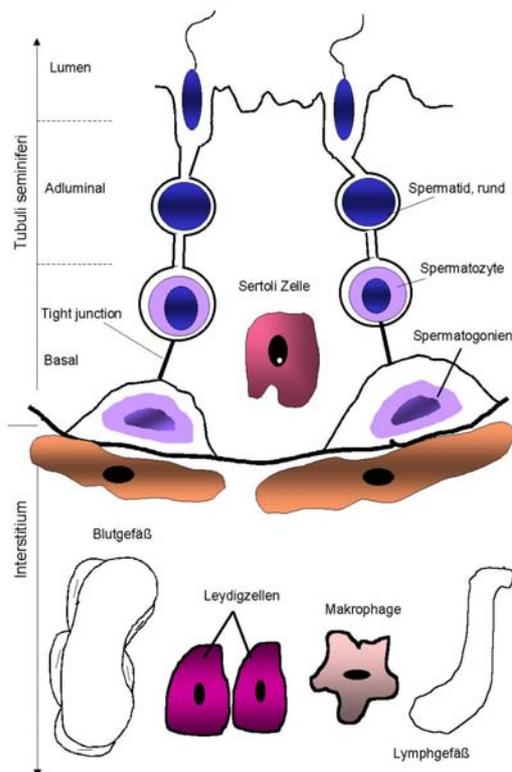


Abb. 2 Schematisches Diagramm der Tubuli seminiferi und des Interstitiums des humanen Hodens. In den Tubuli umhüllen Sertolizellen die sich entwickelnden Keimzellen und formen Tight Junctions aus, welche die Tubuli in ein basales Kompartiment (enthält die Spermato gonien) und in ein adluminale Kompartiment (enthält Spermatozyten und Spermatozide) unterteilen. (Verändert nach Adashi, Rock und Rosenwaks, Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology Vol1).

In der proliferativen Phase sind Spermatogonien im basalen Kompartiment der Tubuli seminiferi zu finden (Abb.2) und durch Tight Junctions der Sertolizellen von anderen sich entwickelnden Keimzellen räumlich getrennt. A-Spermatogonien stellen die spermatogenen Stammzellen dar (weisen eine geringere mitotische Aktivität auf), oder sie vollziehen weitere mitotische Zellteilungen und differenzieren so letztendlich zu B-Spermatogonien. Diese B-Spermatogonien vollziehen eine weitere mitotische Teilung und entwickeln sich zu den ruhenden primären Spermatozyten, welche in die verlängerte meiotische Phase eintreten. Im Kontrast zu Nagern (25 Mio Spermien/g Hoden) haben Primaten, Menschen eingeschlossen, eine sehr niedrige Rate der mitotischen Teilung, was zur Produktion von nur 4,4 Mio Spermien/g Hoden führt. Die proliferative Phase ist durch einen diploiden Chromosomensatz der Spermatogonien gekennzeichnet. Nach Vollendung der DNS-Synthese treten die primären Spermatozyten in die erste meiotische Teilung ein. Nach Vollendung der ersten meiotischen Teilung bilden sich aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten, welche je einen haploiden Chromosomensatz enthalten. Nach einer kurzen Interphase treten die sekundären Spermatozyten in die zweite meiotische Teilung ein. Die dritte Phase ist die Spermiogenese, in der die haploiden runden Spermatiden zu reifen Spermatozoen differenzieren, welche die Fähigkeit der Motilität und Fertilität bereits in sich tragen. Diese Phase beinhaltet weitreichende morphologische und funktionelle Veränderungen, ohne dass weitere Zellteilungen erfolgen. Die Hauptveränderungen, die während dieser Phase stattfinden, sind die Ausbildung des Flagellums, welches die Motilität im weiblichen Genitaltrakt garantiert, die Entwicklung des Akrosoms, welches die proteolytischen und hydrolytischen Enzyme zur Penetration der Oozyten-Plasmamembran beinhaltet, die Kondensation der Chromosomen und der Nukleoproteine, um den Spermienkopf auszubilden, die Rückbildung des Spermatiden-Zytoplasmas, sowie die Spermiation, also die Überführung der Spermien in das Lumen der Tubuli seminiferi.

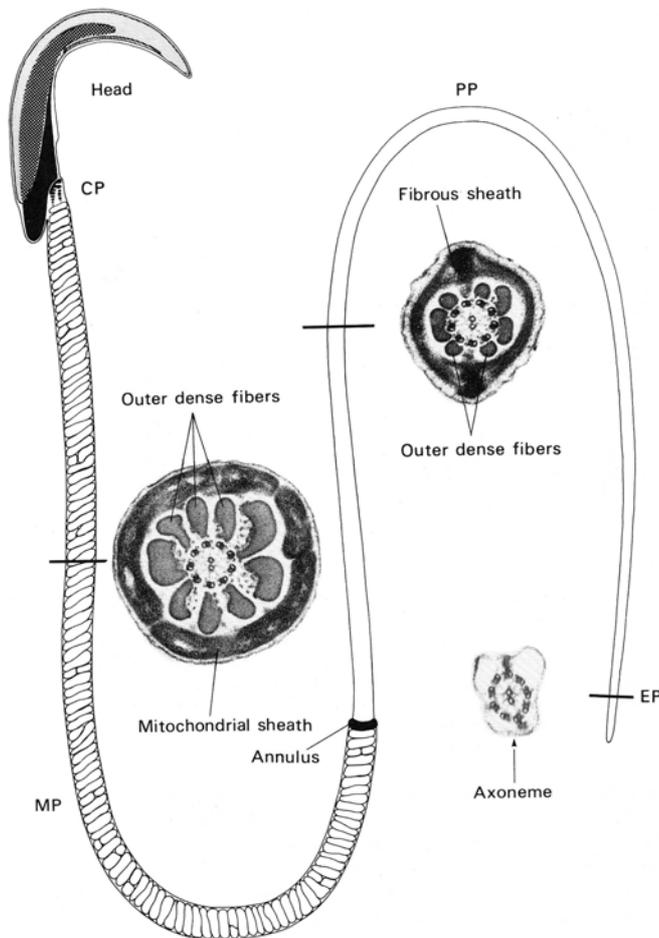


Abb. 3 Aufbau eines Rattenspermiums CP: Connecting piece, MP: Midpiece, PP: Principal piece und EP: Endpiece. Aus Gagnon C: Controls of sperm motility: Biological and clinical aspects, CRC-Press, 1990

Da die Prozesse nahezu simultan verlaufen, werden diese zellulären Transformationen in vier Phasen unterteilt: Während der Initialphase (Golgi-Phase) der Spermiogenese produziert der Golgi-Apparat der Spermatide ein akrosomales Vesikel. Das Flagellum wird ausgebildet, das nach dem typischen „9+2“-Muster (neun äußere Paare und zwei zentrale Paare von Mikrotubuli, s. Abb.3) aufgebaut ist. In der Cap-Phase beginnt das Akrosom das akrosomale Cap auszubilden.

In der akrosomalen Phase der Spermiogenese bildet sich die sogenannte Manschette (cylindric sheath) aus longitudinal angeordneten Mikrotubuli aus. Während dieser Phase wird auch der Spermien-Schwanz weiter ausgebildet und der Nacken oder das Connecting piece (CP) formt sich aus. Das Principal piece (PC) wird durch eine fibröse Hülle (Fibrous Sheath) gestützt. Mitochondrien beginnen sich in einer Spirale um die äußeren Fasern des Mittelstückes zu legen und bieten somit weitere strukturelle Unterstützung sowie die Energie, die für die Spermienmotilität benötigt wird. In der Reifungsphase, welche die abschließende Phase der

Spermiogenese und damit der Spermienreifung darstellt, werden die Reste des Spermatiden-Zytoplasmas von Sertolizellen aufgenommen und formen die Residual-Körperchen.

Die Vollendung eines spermatogenen Zykluses im menschlichen Hoden dauert 16 ± 1 Tage. Die Gesamtdauer von der Ausbildung der Spermatogonien bis zur Ausschüttung der Spermatiden ins Lumen der Tubuli beträgt 74 ± 4 Tage (ungefähr 4,6 spermatogene Zyklen).

1.3 Reifung der Spermien im Nebenhoden und Ejakulation

Nach der Spermatogenese werden die immotilen Spermatozoen in die Rete Testis transportiert, welche mit der Epididymis durch ca. 10-20 Vasa efferentia verbunden ist. Die Hauptrolle bei der post-testikulären Spermienreifung spielt der Nebenhoden, die Epididymis. In der Epididymis werden die überwiegend immotilen Spermien durch die Zilien des luminalen Epithels sowie durch Kontraktionen der glatten Muskulatur transportiert (Bedford, 1975). Beim Menschen dauert der Transport der Spermien durch die Epididymis ca. 12 Tage (Rowley et al., 1970). Es sind vor allem Veränderungen der Spermienoberfläche, die während des epididymalen Transits vorgenommen werden. Dabei werden die Spermienmembranen so verändert, dass sie immunosuppressiv gegenüber dem weiblichen Reproduktivtrakt werden. Nachdem die Spermien die Lumina der Tubuli seminiferi verlassen haben, sind auf der Oberfläche sowohl integrale Membranproteine als auch nur leicht mit der Oberfläche assoziierte Proteine zu finden. Viele dieser Proteine gehen während des Transits durch den Nebenhoden verloren oder werden enzymatisch verändert (Jones, 1989). So nimmt zum Beispiel der Gehalt an mitochondrialer Malat-Dehydrogenase ab. Auch werden neue Proteine sezerniert, **die an die Spermienmembran angelagert werden**, wie z.B. Phospholipase C (Bansal et al., 1991; Orgebin-Christ MC, 1987). Reife Spermien sind von einer karbohydratreichen Glykokalix umgeben. Viele Forscher sind der Meinung, dass diese Glykokalix Modifikationen ihrer Karbohydratgruppen während der Spermienreifung im Nebenhoden erfahren. Obwohl die Modifikationen noch nicht im Detail erforscht sind, konnten Lektin-Bindungsstudien zeigen, dass die Zuckerreste der Spermienplasmamembran während des Transits verändert werden. (Yanagimachi,

1994; Eddy, et al., 1994). So konnten Hermo et al. 1991 zeigen, dass ein Glykoprotein namens Clusterin während des epididymalen Transits an der Spermienoberfläche erscheint. Die Epididymis scheint tatsächlich eine der reichsten Quellen für Exoglykosidasen im menschlichen Körper zu sein, und es gibt viele Berichte über eine aktive Glykosylierung innerhalb des Lumens. Zwei Gruppen von Glykoprotein-modifizierenden Enzymen sind in Spermien vorhanden, Glykosyltransferasen und Glykohydrolasen (Tulsiani et al., 1993 und 1995). In Ratten und Maus-Modell Systemen wurden epididymale Sekret-Proteine, die mit der Spermienmembran interagieren, ausführlich untersucht (Brooks, 1987; Cooper, 1992). Die in diesen Modellsystemen gewonnenen Erkenntnisse lassen sich aber nur schlecht auf den Menschen übertragen, da die sekretorischen Proteine der Epididymis eine hohe Spezies-Spezifität, d.h. eine geringe Konservierung aufweisen. Aufgrund der Stimulation von α -adrenergen Neuronen erfolgt die Ejakulation. Dabei werden die Spermien von der Cauda epididymis durch die Samenleiter ejakuliert und mit Sekreten der Samenbläschen und Prostata vermischt (Lundquist, 1949). Dabei machen die Spermien selber nur ca. 5% des Gesamtvolumens des Ejakulates aus, 50-60 % des Gesamtvolumens besteht aus dem Sekret der Samenbläschen, welches u.a. Fruktose, Phosphorylcholin, Ascorbinsäure, und Prostaglandine enthält. Das Sekret der Prostata, welches Spermin, saure Phosphatase, Zitronensäure, Cholesterol, Phospholipide, Glutaminsäure, Zink (bis 2 mM), und Prostata Specific Antigen zur Verflüssigung des Ejakulates enthält, macht ca. 30-40 % des Ejakulates aus. Als normale Parameter gelten laut WHO ≥ 2 ml Ejakulat mit ≥ 20 Mio. Spermien /ml, von denen entweder 50% schnell progressiv-motil und langsam progressiv-motil, oder 25% schnell progressiv-motil sein müssen. Der pH des Seminalplasmas liegt zwischen 7.2 und 7.8.

1.4 Auf dem Weg zur Eizelle

Ejakulierte Spermien sind trotz der während des epididymalen Transits erworbenen morphologischen Differenzierung nicht in der Lage, ein Ei zu befruchten, da sie noch nicht progressiv-motil sind. Im Ejakulat sind sogenannte Dekapazitationsfaktoren wie Uteroglobulin und Transglutaminase vorhanden (Luconi et al., 2000). Die Spermienfunktionen werden ganz wesentlich von der Umgebung im weiblichen

Genitaltrakt beeinflusst. Die Spermien dringen in den Cervix der Frau. Nur ein geringer Anteil der ejakulierten Spermien kann diesen durchdringen. Im Cervix sind die Spermien dann progressiv motil. Sie bewegen sich weiter auf den Ort der Fertilisation, die Ampulla, durch die uterotubale Verbindung zu. Erst hier erwerben sie die Fähigkeit, ein Ei zu befruchten, indem sie den ersten Schritt, die Hyperaktivierung, d.h. eine hyperaktive Motilität, vollziehen. Tash et al. konnten bereits 1986 zeigen, dass cAMP-medierte Signalwege eine bedeutende Rolle beim Erwerb der Spermien-Motilität spielen. Leclerc et al. zeigten, dass die durch cAMP induzierte Tyrosinphosphorylierung in humanen Spermatozoen eine wichtige Voraussetzung für den Erwerb der Motilität und die Kapazitation ist (Leclerc et al., 1996). Si et al. (1995) konnten zeigen, dass cAMP-abhängige Phosphorylierung das Mikrotubuligleiten reguliert. Ca^{2+} spielt ebenfalls eine wichtige Rolle beim Erwerb der Motilität in verschiedenen Spezies (Norton et al., 1974; Feng et al., 1988). Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch Bicarbonat zu einer höheren Schlagfrequenz führt. Aitken et al. zeigten 1998, dass der cAMP-Signalweg auch durch reaktive Sauerstoff-Atome (reactive oxygen species, ROS) beeinflusst werden kann und ROS somit zur Tyrosinphosphorylierung und damit assoziiertem Erwerb der Spermienmotilität führen. Erreichen die Spermien die Cumulus-Matrix der Oozyte, erfolgt die Kapazitation. Als Kapazitation faßt man all die physiologischen Veränderungen zusammen, die es einem Spermium ermöglichen, die Akrosomen-Reaktion zu vollziehen. Die Akrosomen-Reaktion stellt den wesentlichen Schritt auf dem Weg zur Befruchtungsfähigkeit dar.

Die Signalwege, die zur Kapazitation führen, sind denen der Initiation der Motilität ähnlich. Ein erster herausragender Schritt auf dem Weg zur Kapazitation sind multiple Veränderungen der Plasmamembran-Zusammensetzung. Hierbei wird vor allem der Entfernung von Cholesterol aus der Plasmamembran eine wichtige Rolle zugeschrieben (s. Abb. 4). Serum Albumin scheint in vitro ein geeigneter Kandidat als Cholesterol-Akzeptor zu sein (Davis et al., 1980; Espinosa et al., 2000). Visconti et al. konnten 1999 zeigen, dass die Kapazitation verhindert wird, wenn Cholesterol ins Kapazitationsmedium hinzugegeben wird. Dieser Efflux von Cholesterol und auch anderer Sterole wie z.B. Demosterol aus der Plasmamembran führt zu einer verminderten Cholesterol/Phospholipid-Ratio und somit zu einer veränderten Membranfluidität, welche der Auslöser multipler Signalvorgänge der Kapazitation ist. Gadella und Harrison konnten zeigen, dass ein cAMP-abhängiger Signalweg die

Änderungen der Transbilayer-Phospholipid-Eigenschaften hervorrufen kann. Dieser wird ausgelöst, nachdem dem Medium Bicarbonat (HCO_3) hinzugefügt wurde (Gadella und Harrison 2000). Vermutlich verläuft dieser Signalweg über eine Aktivierung der Adenylatzyklase durch HCO_3 . Auch eine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch Einstrom von Na^+ und Ausstrom von H^+ führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und somit zu vermehrter Bildung des intrazellulären Botenstoffes cAMP, welcher wiederum Proteinkinasen wie Tyrosinkinasen und Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Hierbei bindet cAMP an die regulatorische Untereinheit der PKA und führt somit zu einer Dissoziation des inaktiven Komplexes aus je zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten der PKA, wodurch diese aktiviert wird. Über bisher noch nicht identifizierte weitere Kinasen führen die Signalwege der Kapazitation letztendlich zur Tyrosinphosphorylierung spezieller Zielproteine. Einige dieser tyrosinphosphorylierten Zielproteine sind z.B. die AKAPs (A Kinase Anchoring Protein), die in der fibrösen Hülle der Spermien lokalisiert sind. Diese Tyrosinphosphorylierung könnte die biochemischen Eigenschaften der AKAPs so verändern, dass sie zur Regulation des Flagellum-Schlages durch Erhöhung der Schlagfrequenz während der Hyperaktivierung beitragen könnten (Carrera et al., 1996; Mandal et al., 1999; Vijayaraghavan et al., 1999). Da auch das weibliche Fluid teilweise aus dem Serum stammt, könnten Serum-assoziierte Sterole als Akzeptoren dienen. Obwohl es inzwischen als erwiesen angesehen wird, dass die Entfernung von Cholesterol aus der Plasmamembran einer der initiierenden Effekte der Kapazitation ist, sind die Signalwege, die dadurch ausgelöst werden, noch weitgehend unerforscht. In somatischen Zellen gehen die Erkenntnisse dahin, dass der Cholesterol-Efflux zur Zerstörung der Lipid-Rafts beiträgt, was zur Aktivierung von Tyrosin-Kinasen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt. Auch in Spermien könnte das Cholesterol in solchen speziellen Plasmamembran-Mikrodomänen wie Lipid Rafts und Caveolae konzentriert sein.

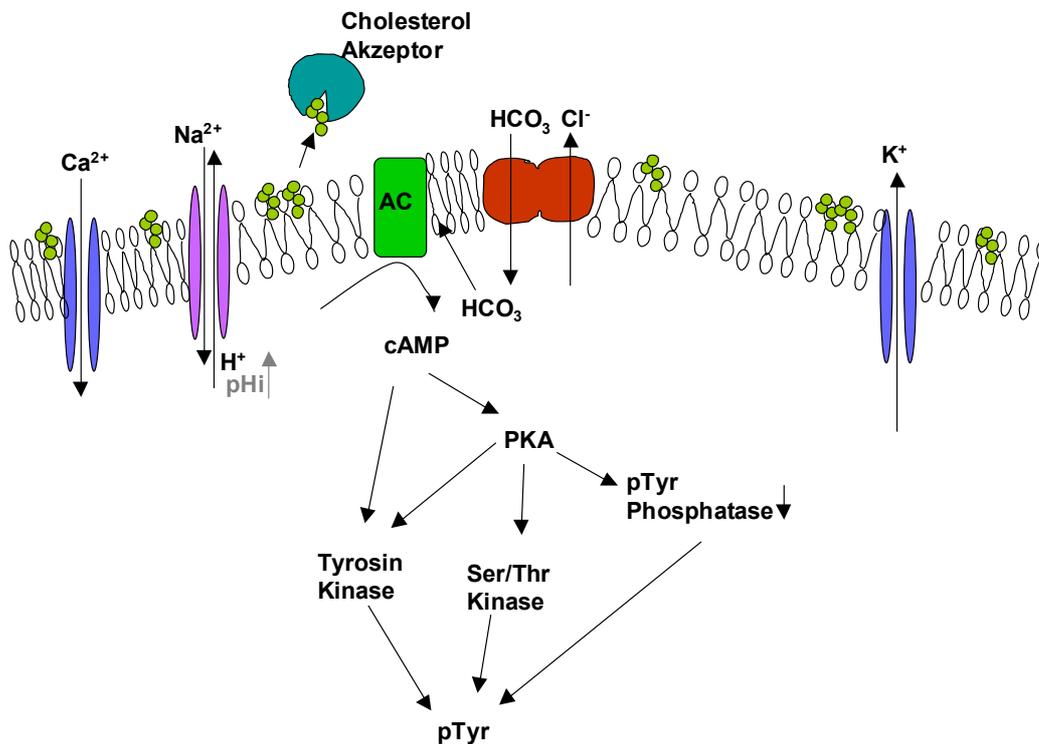


Abb. 4 Zusammenfassung der Signaltransduktionsmechanismen in Säugetier-Spermien während der Kapazitation.

Diese Vermutung wird durch neueste Untersuchungen von Travis et al. gestützt, welcher einen wichtigen Bestandteil der Caveolae, Caveolin-1, in der Plasmamembran der Akrosomen-Region und des Flagellums in Maus- und Meerschweinchen-Spermien nachweisen konnte (Travis et al., 2000).

Da all diese Signalereignisse in Spermien-Kaskaden überwiegend über cAMP vermittelt werden, deuten alle bisherigen Ergebnisse auf eine zentrale Rolle der Adenylatzyklase in Spermien hin. In Kapitel 1.6 wird deshalb genauer auf den Aufbau und die Funktionen der Adenylatzyklase eingegangen.

1.5 Befruchtung der reifen Oozyte

Die Oozyte ist von einer Cumulus-Matrix und der Zona Pellucida umgeben. Nur hyperaktive Spermien können diese erreichen und lediglich bereits kapazitierte Spermien sind in der Lage, die Cumulus-Matrix auch zu durchdringen. Nach dem Durchdringen der Cumulus Matrix bindet das Spermium an die Zona Pellucida, die innere Schicht aus azellulären Matrixproteinen. Diese enthält auch die Liganden für die Spermienbindung, Zona Pellucida Protein 3 und 2 (ZP3, ZP2). Die Zona Pellucida Proteine 1, 2 und 3 sind hochglykosylierte Proteine, welche ein dichtes Netzwerk ausbilden. Nach der Bindung an das ZP3-Protein werden dessen Karbohydrate so modifiziert, dass eine Bindung eines weiteren Spermiums nicht mehr möglich ist. Die Bindung an das ZP3-Protein induziert in Spermien die Akrosomen-Reaktion.

Das Akrosom wird sowohl als spezialisiertes Lysosom als auch als sekretorischer Vesikel beschrieben (Allison et al., 1970; Mann et al., 1981).

Die innere Akrosomen-Membran liegt über der äußeren Membran des Nukleus, die äußere Akrosomen-Membran liegt nahe der cytoplasmatischen Oberfläche der Plasma-Membran. Während der Akrosomen-Reaktion fusioniert die äußere Akrosomen-Membran mit der Plasmamembran und die entstandene Hybrid-Membran vesikuliert (Barros et al., 1967). An dieser Membran-Fusion ist eine Familie von Proteinen namens SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) beteiligt (Rothmann, 1994). V-SNARE ist mit der Membran des akrosomalen Vesikels assoziiert, das Target (t)-SNARE an der Plasmamembran. Syntaxin 2, ein Mitglied der SNARE-Familie, wurde in der akrosomalen Region von Maus- und Hamster-Spermien nachgewiesen (Katafuchi et al., 2000). Das Akrosom enthält u.a. folgende Enzyme: Proacrosin, eine Serin-Protease, welche einzigartig in Spermien ist, β -N-Acetylglukosamidase, saure Phosphatase (Gonzales et al., 1973; Stambaugh et al., 1970), Cathepsin-D-like Peptidase, nicht-spezifische Esterasen (Bryan et al., 1972; Erickson et al., 1974), β -Galaktosidase, Hyaluronidase (Harrison 1988; Majumder et al., 1974), sowie die Phospholipasen A und C (Kinkovska-Galchev et al., 1992; Meizel et al., 1984).

Die Signaltransduktionsmechanismen, die zur Akrosomen-Reaktion führen, sind in Abb. 5 zusammengefaßt.

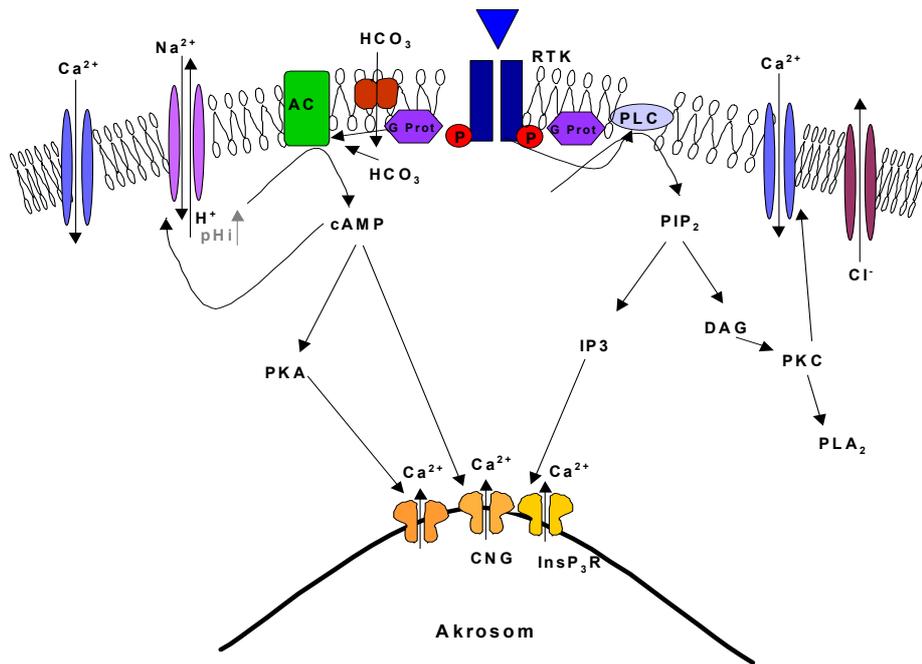


Abb. 5 Zusammenfassung der bisher bekannten Signaltransduktionsmechanismen in Säugetier-Spermien bei der Akrosomen-Reaktion.

Die Auslösung der Akrosomen-Reaktion scheint ein klassisches Ligand-Rezeptor-System zu sein. Da die Kapazitation ein erster Schritt auf dem Weg zur Akrosomen-Reaktion ist, sind all die Signaltransduktionsmechanismen der Kapazitation auch die der Akrosomenreaktion (s.S. 9). Die Bindung des Spermien-Rezeptors an den Liganden ZP3 führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Akrosomen-Reaktion wird als Ca^{2+} -vermittelte Exozytose verstanden. Deshalb spielen solche Signaltransduktionsmechanismen eine große Rolle, die die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Kanälen und damit die Ausschüttung von Ca^{2+} bewirken (Abb. 5). Die Aktivierung von spannungsabhängigen T- Ca^{2+} -Kanälen konnte gezeigt werden (Darszon et al., 1999). Ob Kalzium-Depots in Spermien vorhanden sind, wird aber immer noch kontrovers diskutiert (Walensky et al., 1995, O'Toole et al., 2000). Auch eine bedeutende Rolle des intrazellulären Botenstoffes

cAMP und damit der Adenylatzyklase ist gezeigt worden. Zhang et al. (1996) konnten einen ansteigenden cAMP-Spiegel während der Akrosomen-Reaktion nachweisen, und verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Inhibierung der PKA sowohl die Kapazitation als auch die Akrosomenreaktion verhindert (Visconti et al., 1995; Baldi et al., 1991; Bielfeld et al., 1994). cAMP wirkt direkt auf Ca^{2+} -Kanäle, welche durch zyklische Nukleotide reguliert werden (cyclic nucleotide gated channels) oder durch Aktivierung der PKA die Phosphorylierung und damit einhergehende Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle bewirken (Kawasaki et al., 1998; Gauss et al., 1998; Weyand et al., 1994). Erst vor kurzem wurde ein nur in Spermien exprimierter spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal (CatSper) entdeckt, dessen Knock-out zur kompletten Infertilität bei Mäusen führt (Ren et al., 2001; Quill et al., 2001). Die Bindung an den ZP3-Rezeptor vermittelt auch über G-Protein gekoppelte Mechanismen die Aktivierung der Phospholipase C und führt damit zur Aktivierung der intrazellulären Botenstoffe Inositol 1, 4, 5-Triphosphat und Diacylglycerol, welche ebenfalls Ca^{2+} -Kanäle öffnen.

Erst nach Vollzug der Akrosomen-Reaktion erfolgt die sekundäre Bindung an das ZP2-Protein. Als letzter Schritt wird die Plasmamembran-Fusion vollzogen. Hierbei scheint Fertilin (ehemals PH-30) auf der Spermienoberfläche eine wichtige Rolle zu spielen. Es bindet vermutlich die Integrin-Rezeptoren an der Plasmamembran der Oocyte. Nach dieser Fusion wird die Kortikal-Reaktion ausgelöst, bei der die kortikalen Granula frei werden. Die Kortikal-Reaktion involviert die Fusion der Granula-Membran mit der Plasmamembran und entlässt den Inhalt in den Perivittellarraum und auch in die Zona Pellucida. Dies führt zu einem „Aushärten“ der Zona Pellucida durch Modifikation der Karbohydrate und verhindert somit eine Polyspermie. Die wesentlichen Schritte von der Ejakulation bis zur Befruchtung sind also Kapazitation, Eindringen in und Durchdringen der Cumulus Matrix, primäre Bindung an ZP3, Auslösung und Vollziehung der Akrosomen-Reaktion, sekundäre Bindung an ZP2 und Fusion der beiden Plasmamembranen.

1.6 Die etablierten Regulatoren der Spermienmotilität

1.6.1 Adenylatzyklase

In den späten 50-er Jahren entdeckte die Arbeitsgruppe um Sutherland das zyklische 5', 3'-Monoadenosinphosphat (cAMP) und schuf somit das Paradigma der durch intrazelluläre Botenstoffe vermittelten Hormonwirkung. Dabei kann cAMP nicht nur durch Aktivierung der PKA und der damit einhergehenden Proteinphosphorylierung wirken, sondern ebenfalls direkt Effekte durch Phosphorylierungs-unabhängige Induktion von Protein-Protein Interaktionen ausüben. Adenylatzyklasen (AC) sind die Enzyme, welche ATP in cAMP konvertieren. Dafür ist es Bedingung, dass die 3'ATP-Hydroxylgruppe für den nukleophilen Angriff deprotoniert und somit aktiviert wird. Diese Reaktion ist von divalenten Kationen, meist Mg^{2+} , abhängig. Bisher sind neun nah verwandte Isoformen, AC1-AC9, und zwei Splicevarianten der AC8, kloniert und charakterisiert worden. Ihnen gemeinsam ist eine große Sequenzhomologie in ihren katalytischen Untereinheiten und die gemeinsame dreidimensionale Struktur. Diese Struktur beinhaltet zwei hydrophobe Domänen mit je sechs Transmembrandomänen (M1 und M2) und zwei zytoplasmatische Domänen (C1 und C2), was zu einem pseudosymmetrischen Protein führt (Abb. 6).

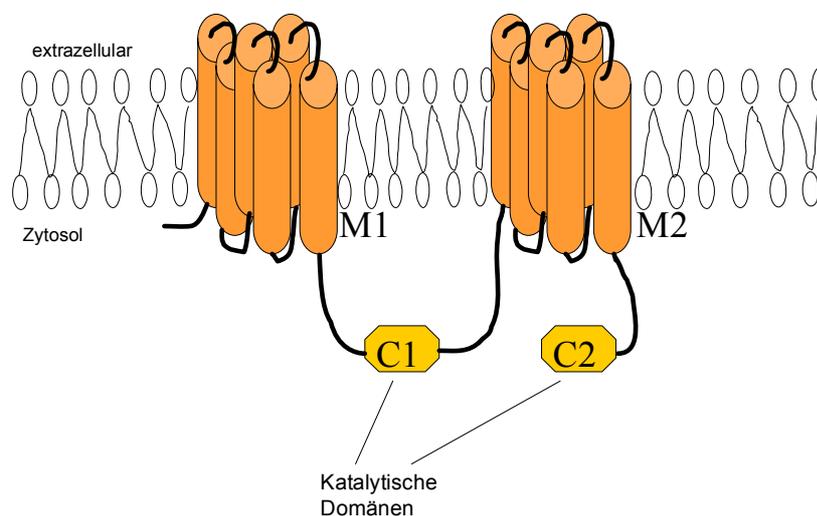


Abb. 6 Schematische Struktur der Adenylatzyklase. Das aktive Enzym besteht aus je zwei sechs-Transmembrandomänen (M1, M2) und zwei katalytischen Domänen (C1, C2), welche ein pseudosymmetrisches Protein ausbilden. Verändert nach Hurley, (1999).

C1 und C2 bilden das katalytisch aktive Zentrum aus (Tang et al., 1995). Die Nucleotid-Bindungsstelle des Enzyms liegt in der katalytischen Domäne C2 (Tang et al., 1995; Yan et al., 1997, Tucker et al., 1998, Sunahara et al., 1998). Lys-923 und Asp-1000 interagieren direkt mit N1 und N6 des Adenin-Ringes. Adenylat-Zyklasten sind von der Präsenz divalenter Kationen wie Mg^{2+} abhängig. Die Bindung scheint ein zwei-Ionen Mechanismus zu sein, wobei ein Ion als freies Magnesium, das andere im Komplex mit ATP agiert (Pieroni et al., 1995; Zimmermann et al., 1998). Aber auch Mn^{2+} und Ca^{2+} führen zu einer starken Aktivierung der Adenylatzyklase-Aktivität, obwohl das Enzym keine Bindungsstellen für diese Ionen aufweist. Viele Enzyme können aktiviert werden, indem Mg^{2+} durch Mn^{2+} ersetzt wird. Dieser Mechanismus beruht wahrscheinlich darauf, dass beide Ionen nahezu die gleiche Größe haben, aber Mn^{2+} eine stärkere Lewis-Base ist. Ca^{2+} bindet in hohen Konzentrationen kompetitiv an die Mg^{2+} -Bindungsstellen, kann dies aber katalytisch nicht ersetzen. Die Adenylatzyklasten 5 und 6 werden durch freies Ca^{2+} sogar gehemmt (Yoshimura et al., 1992). Die beiden zytoplasmatischen Domänen werden je nach Isotyp spezifisch reguliert und führen somit zu der Möglichkeit, dass in Geweben unterschiedlich exprimierte Isoenzyme auch unterschiedlichen, dem Gewebe angepassten Regulationsmechanismen unterliegen. Dadurch wird das Bild, dass Adenylatzyklasten nur lineare Vermittler der Signalwege G-Protein gekoppelter Rezeptoren sind, widerlegt. Die Isoformen AC1, AC2, AC3, AC4, AC5, AC7, AC8, und AC9 kommen im Gehirn vor. Im Herzen spielen AC2, AC3 und AC4 eine herausragende Rolle.

AC3 wurde auch in männlichen Keimzellen gefunden und AC8 wird im Hoden exprimiert. Studien von Gautier-Courteille et al. (1998) zeigten, dass AC3 auf den akrosomalen Membranen der runden und reifen Spermatozoen lokalisiert ist. Diese Lokalisation läßt eine Rolle der AC3 während der Biogenese des Akrosoms und auch während der Gametenproduktion und Fertilisation vermuten.

AC3 und AC8 werden durch Ca^{2+} (Calmodulin) aktiviert. Allen Adenylatzyklase-Isoformen ist die Aktivierung durch $G_{\alpha s}$ und durch Forskolin gemeinsam. Auch Proteinkinase C (PKC) kann zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase führen, indem sie Thr-1057 phosphoryliert (Bol et al., 1997). Die Aktivierbarkeit durch PKC wird von den Isoformen AC1, AC2, AC3, AC4, AC5, und AC7 berichtet, während PKC auf AC6 hemmend wirkt und auf die Aktivität der AC8 keinen Einfluss zu haben scheint. $G_{\alpha i}$ führt zu einer Inhibierung der Aktivität bei AC1, AC3, AC5, AC6, AC8 und AC9, hat

aber keinen Effekt auf AC2. In den männlichen Keimzellen wurde eine weitere Form außer der AC3 nachgewiesen, die lösliche Adenylatzyklase (sAC). Ihre Aktivität wurde in zytosolischen Extrakten von Spermatischen nachgewiesen, und sie ist insensitiv gegenüber allen bisher bekannten Aktivatoren der membrangebundenen Adenylatzyklase-Isoformen. Die Aktivität der Adenylatzyklase ist abhängig vom divalenten Kation Mn^{2+} . All diese Eigenschaften lassen darauf schließen, dass die lösliche Adenylatzyklase molekular unterschiedlich von den membrangebundenen ist. Im menschlichen Hoden wurde eine weitere Form der sAC gefunden, deren katalytische Domäne denen in Cyanobakterien und Myxobakterien sehr ähnelt (Buck et al., 1999).

1.6.2 Guanylatzyklase

Analog zu den Adenylatzyklasen sind Guanylatzyklasen die Enzyme, die GTP in cGMP (zyklisches Guanodinmonophosphat) konvertieren. Wie die Adenylatzyklasen sind auch die Guanylatzyklasen nur als Dimere in der Lage, ihre katalytische Aktivität zu entfalten. Auch die Guanylatzyklasen benötigen divalente Kationen, wobei Mn^{2+} ein 10-fach höheres Aktivierungspotential aufweist als Mg^{2+} . Auch Ca^{2+} erwies sich in Konzentrationen von 10^{-4} M als Aktivator, allerdings wirken Konzentrationen von 10^{-8} M bis 10^{-5} M inhibierend (Wallach et al., 1976; Levine et al., 1979). cGMP hat einen Effekt auf das Zellwachstum durch Stimulation der DNA-, RNA- und Proteinsynthese (Vesely, 1980; Kram et al., 1973, Paulus et al., 1974; Varrone et al., 1973). In der Retina spielt cGMP eine bedeutende Rolle bei der Signaltransduktion via den Photorezeptoren (Fesenko et al., 1985; Haynes et al., 1985). Des Weiteren hat cGMP vasodilatatorische und somit Blutdruck-senkende Effekte, da es glatte Muskelzellen relaxiert (Vesely DL et al., 1987). Dieser vasodilatatorische Effekt ist Kalzium-unabhängig. Auch ist für cGMP ein natriuretischer Effekt nachgewiesen (Huang et al., 1986), da es die Glomeruli der Niere vasodilatiert kann. Dies geschieht vermutlich durch Bindung an den Natrium-Kanal, welcher sich daraufhin schließt (Zeidel et al., 1987).

cGMP reguliert die zellulären Mechanismen durch Aktivierung der Proteinkinase G, durch einen direkten Effekt auf durch zyklische Nukleotide geöffnete Kanäle (cyclic nucleotide gated channels) und durch Veränderungen der intrazellulären

Konzentration an zyklischen Nucleotiden durch Regulation der Phosphodiesterasen (PDE).

In den späten 60-er Jahren wurde Guanylatzyklase-Aktivität sowohl in den partikulären als auch in den löslichen Fraktionen vieler Zellen nachgewiesen (Hardmann und Sutherland, 1969; Ishikawa et al., 1969). Eine besonders wichtige Rolle spielen die Guanylatzyklasen in den Spermien des Seeigels. In keinen anderen Zellen konnte bisher eine so hohe Guanylatzyklase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Guanylatzyklase-Aktivität in diesen Spermien ist mehr als hundertfach höher als im den meisten aktiven Säuger-Geweben, wie z.B. Lunge (Hartmann et al. 1969) und sie ist sogar höher als die Adenylatzyklase-Aktivität in Säugetier-Spermien (Gray et al., 1976). Bis heute sind 7 Isoformen der partikulären Guanylatzyklase (GC-A, B, C, D, E, F und G) und eine lösliche Guanylatzyklase mit je zwei verschiedenen α - (α_1 , α_2) sowie β - (β_1 , β_2) Untereinheiten nachgewiesen worden (Gerzer et al., 1981; Koesling et al., 1988; Singh et al., 1988; Chang et al., 1989; Schulz et al., 1990; Harteneck et al., 1991; Shyjan et al., 1992; Fülle et al., 1995; Schulz et al., 1998).

Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) wurde in Lunge, Cerebellum, Cerebrum, Herz, Niere, Leber, Skelettmuskel, Retina und Plazenta (Lucas et al., 2000) nachgewiesen. Auch von humanen Spermien wurde kürzlich berichtet, dass die Akrosomen-Reaktion durch einen Aktivator der löslichen Guanylatzyklase, Stickstoffmonoxid (NO), beeinflusst werden könne (Ravelli et al., 2001).

sGC ist ein Heterodimer aus je einer α - und β -Untereinheit (s. Abb. 7), wobei die β -Untereinheit ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa, die α -Untereinheit ein Molekulargewicht von ca 80 kDa aufweist.

Da partikuläre Guanylatzyklasen vasodilatatorische Effekte haben und nachgewiesen wurde, dass die Spermien-Guanylatzyklase in Seeigel-Spermien von Ei-sezernierten Peptiden Spezies-spezifisch aktiviert werden (Chemotaxis) (Suzuki et al., 1984), ist davon auszugehen, dass die membrangebundenen Guanylatzyklasen auch Rezeptoren für Peptid-Liganden sind. Hamet et al. (1984) konnten nachweisen, dass ANP (Atriales Natriuretisches Peptid) die Guanylatzyklase aktiviert und zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration führt.

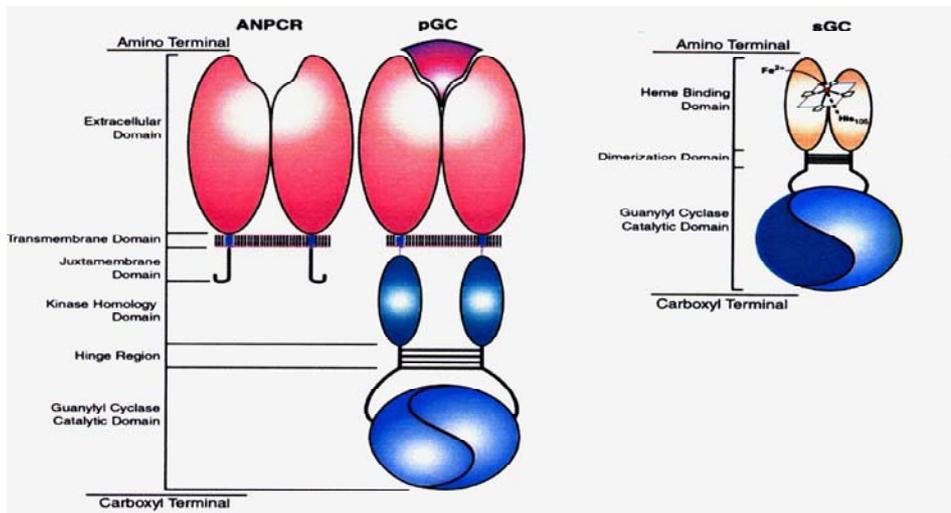


Abb.7 Domänen-Struktur der Guanylatzyklen. Membranebundene Guanylatzyklen bestehen aus Ligandenbindungs-, einer extrazellulär-, Transmembran-, Kinase-Homologie-, Hinge- und einer katalytischen Domäne. Die Abbildung zeigt ein Homodimer, wie es GC-A und GC-B entspricht. GC-C (ANPCR), D, E und F haben eine carboxyterminalen Schweif, der hier nicht mit aufgeführt wird. Dem Clearance-Rezeptor ANPCR fehlen Kinase-Homologie-, Hinge- und katalytische Domäne. sGC sind Heterodimere welche aminoterminal eine regulatorische Domäne aufweisen, die eine Häm-enthaltende prosthetische Gruppe hat. Des Weiteren besitzen sie eine Dimerisierungs- und eine katalytische Domäne. Aus Lucas et al., 2000

Es konnte gezeigt werden, dass Guanylatzyklase A und B (GC-A, GC-B)-Rezeptoren für natriuretische Peptide sind. GC A bindet dabei selektiv ANP und BNP (brain natriuretic peptide), GC-B bindet selektiv nur CNP (C-type natriuretic peptide). Der Clearance Rezeptor GC-C (ANPCR) bindet hingegen alle drei natriuretischen Peptide, weist aber keine Guanylatzyklase-Aktivität auf. GC-A und GC-B wurden in adipösen Gewebe, Adrenal-Drüse, Ileum, Niere, Cerebellum, im Herzen, im Ovar und in der Plazenta, in der Schilddrüse sowie in Lunge und im Hoden nachgewiesen. GC-

C hingegen ist ein Rezeptor für bakterielle hitze-resistente Enterotoxine (STs) und die endogenen Peptide Guanylin und Uroguanylin (Schulz et al., 1990; Currie et al., 1992). Es zeigte sich, dass die Peptid-Rezeptoren eine einzelne Transmembran-Domäne besitzen, welche die extrazelluläre Ligandenbindungs-Domäne von der intrazellulären Domäne trennt. Die intrazelluläre Domäne zeigt regulatorische, Dimerisierungs- und katalytische Funktionen (Chinkers und Garbers 1989). Die regulatorische Domäne hat eine Sequenz-Ähnlichkeit mit Protein-Tyrosinkinasen, welche ebenfalls Rezeptoren mit einer einzigen Transmembrandomäne darstellen (Abb. 7). GC-D ist im olfaktorischen Neuroepithel exprimiert. Guanylatzyklase E und F (auch retGC-1 und retGC-2) sind in der Retina exprimiert, GC-E auch in der Epiphyse. GC-G, in Niere, Lunge und Skelettmuskel gefunden und 1998 von Schulz et al. kloniert, zeigt eine Homologie zu GC-A und B, allerdings wird sie nicht durch die natriuretischen Peptide aktiviert.

Außer der GC-F ist allen partikulären Säuger-Guanylatzyklasen mindestens eine N-Glykosylierungsstelle in der extrazellulären Domäne gemeinsam (Chinkers et al., 1989). Diese Glykosylierung scheint eine Rolle bei der Ligandenbindung zu spielen, da glykosylierte GC-A in der Lage ist, ANP zu binden, werden die Karbohydrate aber entfernt, wird ANP nicht mehr an den Rezeptor gebunden (Lowe und Fendly, 1992). Da die partikulären Guanylatzyklasen eine Kinase-Homologie-Domäne aufweisen, ist davon auszugehen, dass auch Phosphorylierungen eine Rolle bei der Aktivierung der Enzyme spielen. GC-A und GC-B liegen im basalen Status als phosphorylierte Proteine vor. Bindet der Ligand an den Rezeptor, erfolgt eine Dephosphorylierung, welche zu einer Desensibilisierung des Rezeptors sowie zu einer Reduktion der Liganden-induzierten Guanylatzyklase-Aktivität führt. GC-A weist mit Ser-497, Thr-500, Ser-502, Ser-506, Ser-510, und Thr-513 sechs Phosphorylierungsstellen innerhalb der Kinase-Homologie-Domäne auf, die auch notwendig zur Liganden-abhängigen Aktivierung sind, da Mutationen dieser Reste zu einer reduzierten Aktivierung des Rezeptors führt (Potter et al., 1992, 1998). In GC-B befinden sich 5 Phosphorylierungsstellen innerhalb der Kinase-Homologie-Domäne, Ser-513, Thr-516, Ser-518, Ser-523, und Ser-526.

Im katalytischen Zentrum sind drei Aminosäuren von besondere Bedeutung, Asp der einen katalytischen Domäne und ein Asn/Arg-Paar der zweiten katalytischen Domäne.

Tatsächlich sind die katalytischen Domänen der Guanylatzyklasen und der Adenylatzyklasen sich sehr ähnlich. Die lösliche Guanylatzyklase der Ratte hat drei invariable Aminosäurereste (Glu, Cys, Arg), deren Position den drei unvariablen Resten in der katalytischen Domäne der Adenylatzyklase (Lys, Asp, Gln) homolog ist. Mutationsversuche, in denen die 3 jeweiligen Aminosäurereste der Zykase durch die der Anderen ersetzt wurde, führten tatsächlich zu einem Austausch der Nukleotid-Spezifität, nicht jedoch zu einem Austausch der Regulatoren. So war die Guanylatzyklase mit jetziger Spezifität für ATP immer noch durch SNP, einem NO-Donor, zu aktivieren (Sunahara et al., 1998).

1.7 Die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3), ein weiterer möglicher Regulator von Spermienfunktionen

Das Enzym Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) wurde zum ersten Mal als Inaktivator der Glykogen Synthase im Skelettmuskel beschrieben (Ballou et al., 1983; Cohen, 1989; Embi et al., 1980). Später wurde gezeigt, dass GSK-3 in der Lage ist, die regulatorische Untereinheit Typ II der PKA zu phosphorylieren (Hemmings et al., 1982). Weitere Studien zeigten, dass GSK-3 eine Multisubstrat-Kinase ist, welche eine Rolle im Energie-Metabolismus, Neuronalzell-Entwicklung, Axis-Ausbildung während der Embryogenese, und auch in der Pathogenese von neurodegenerativen Krankheiten wie z.B. Alzheimer, spielt (Baum et al., 1996).

Das Enzym existiert in zwei Isoformen, GSK-3 α und GSK-3 β mit einem Molekulargewicht von 51 und 46 kDa. GSK-3 α ist 449 Aminosäuren lang und weist am Anfang eine 83 Aminosäuren lange, Glycin-reiche Domäne auf. Die Aminosäuren 113-403 bilden die Proteinkinase-Domäne. Es existieren zwei ATP-Bindungsstellen, im Bereich von AS 125-133 und an der Aminosäure 148. GSK-3 β ist 420 Aminosäuren lang. Ihr fehlt die Glycin-reiche Domäne am N-Terminus. Die Aminosäuren 56-340 bilden die Proteinkinase-Domäne aus, und auch hier gibt es zwei ATP-Bindungsstellen an den Aminosäuren 62-70 und 85.

Phosphorylierung der Serinreste Ser-21 (GSK-3 α) oder Ser-9 (GSK-3 β) führt zu einer Inhibierung der Enzymaktivität, während eine Tyrosinphosphorylierung an Tyr-279 (GSK-3 α) oder Tyr-216 (GSK-3 β) zu einer Aktivierung der Enzymaktivität führt.

Vor kurzem wurde eine dritte Isoform mit 53 kDa beschrieben, welche vermutlich eine GSK-3 α -Variante darstellt, die posttranslational modifiziert wurde (Nikoulina et al., 2000). Da GSK-3 eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Krankheiten spielt, ist sie ein interessantes Untersuchungsobjekt für die Pharmaindustrie. Es sind mehrere Inhibitoren der GSK-3-Aktivität beschrieben. Ein länger bekannter Inhibitor ist Lithium. Doch erst 2001 konnten Ryves und Harwood zeigen, dass Lithium die GSK-3 Aktivität durch Verdrängung von Magnesium inhibiert. Dieser Mechanismus ist allen Säuger-GSK-3 Isoformen gemeinsam und auch die GSK-3 Isoform von *Dictyostelium* wird durch Lithium inhibiert. Cross et al (2001) identifizierten die selektiven kleinen-Molekül Inhibitoren SB 216763 und SB 415286, welche nicht auf andere Mitglieder der GSK-3 Superfamilie wirken und primäre Neuronen vor dem Tod schützten. Paullone konnten als potente Inhibitoren der GSK-3 β -Isoform identifiziert werden (Leost et al., 2000).

Vijayaraghavan et al. berichteten, dass der Erwerb der Motilität in bovinen Spermien während des epididymalen Transits mit einer Abnahme der GSK-3- und Protein Phosphatase-1 (PP1)- Aktivität einhergeht. Die Aktivität der PP1 wird durch zwei hitze-stabile Inhibitoren, I1 and I2 reguliert. I2 bindet an die katalytische Untereinheit der PP1 und bildet so einen inaktiven Komplex aus (PP1I), welcher durch Phosphorylierung des I2 durch GSK-3 in den Inhibitor und die aktive PP1 zerfällt (Vijayaraghavan et al., 1996; Smith et al., 1996). Des Weiteren zeigten Vijayaraghavan et al., dass der Gehalt an tyrosinphosphorylierter GSK-3 α in motilen bovinen Spermien größer ist als in immotilen und dass GSK-3 α sowohl am Flagellum als auch in der anterior Region des Spermienkopfes von Rinderspermien lokalisiert ist (Vijayaraghavan et al., 2000).

1.8 Die Rolle von Zink bei Motilität und Fertilität der Spermien

Das Vorkommen von Zink im Seminalplasma wurde erstmals von Bertrand und Vladesco 1921 berichtet. Zink scheint mit Säugetier-Spermien während der späten Stadien der Spermien-Reifung und während der Ejakulation assoziiert zu sein (Kruczinsky et al., 1985; Bjorndahl et al., 1986). Der Hauptteil des Zinks im Ejakulat stammt aus der Prostata. Die Konzentration im Seminalplasma ist mit bis zu 2mM höher als in allen anderen Körperflüssigkeiten, so liegt z.B. der Gehalt im Blutplasma

zwischen 0,1 und 0.2mM (Eliasson et al., 1971; Srivastava und Setty, 1985). Die Rolle von Zink bei der Regulation von Spermienfunktionen wie Motilität wird kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen schreiben Zink eine Rolle bei der Stabilisierung der Spermienmembran zu. So könnte das Entfernen von Zink nötig sein, um die Fertilität der Spermien zu initiieren (Riffo et al., 1992; Andrews et al., 1994). In humanen Spermien kann Zink den Prostaglandin 1-induzierten Ca^{2+} -Influx und somit die Akrosomen-Reaktion inhibieren. Darum wird Zink als ein Ca^{2+} -Ionenkanal-Blocker angesehen (Schaefer et al., 1998). Auch die klinischen Studien zeigen gegensätzliche Ergebnisse. Einige Autoren konnten eine Korrelation zwischen hohen Zink-Konzentrationen im Seminalplasma und einer abnehmenden Fertilisierung aufzeigen (Pandy et al., 1983; Kavanagh 1983; Carpino et al., 1998; Sörensen et al., 1999; Henkel et al., 1999). Andere Studien jedoch konnten keine Korrelation zwischen der Zink-Konzentration und der Spermienmotilität finden (Lewis-Jones et al., 1996) oder konnten sogar eine Stimulation der Progressiv-Motilität nachweisen (Magnus et al., 1990). Hershinkel et al (2001) berichteten über einen "Zink-sensitiven Rezeptor" in der Colon-Zelllinie HT29, dessen Aktivierung zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führte. Auch hier lässt die Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen auf eine mögliche Rolle von Zink bei der Regulation von Spermienfunktionen wie Motilität, Kapazitation und Akrosomen-Reaktion schließen.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Eine wichtige Voraussetzung für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien ist der Erwerb und die Regulation der flagellaren Motilität. Eine essentielle Rolle wird hierbei den Kinasen, die ihre Zielproteine phosphorylieren, zugeschrieben. Die Bedeutung von cAMP und PKA für die Regulation wichtiger Spermienfunktionen wie Kapazitation und Motilität ist gut dokumentiert. Beiden gemeinsam ist die Regulation von Signaltransduktionsmechanismen durch Phosphorylierung. Die zellulären Mechanismen, die an der Kontrolle der cAMP-Spiegel beteiligt sind und für die Aktivierung oder Inhibierung von Zielproteinen verantwortlich sind, konnten bisher aber noch nicht vollständig aufgeklärt werden. In Spermien vieler Spezies konnte cAMP als Regulator oder Koregulator von Motilität, Kapazitation und Akrosomen-Reaktion

dokumentiert werden. Über eine Rolle von cGMP für die Regulation von Spermienfunktionen beim Menschen sind hingegen bisher kaum Daten vorhanden, obgleich dieser Botenstoff z.B. bei Echinodermen wie dem Seeigel einen wesentlichen Einfluss auf Spermien-assoziierte Prozesse hat.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob cAMP auch bei anderen Signaltransduktionswegen als den bisher bekannten eine Rolle spielt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob cGMP aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden intrazellulären Botenstoffe ähnliche Funktionen bei der Regulation in humanen Spermien hat. Außerdem sollte eine Aussage über die relative Wichtigkeit der beiden Botenstoffe zueinander getroffen werden. Da die Rolle von Zink in der Motilität humaner Spermien sehr kontrovers diskutiert wird, sollte weiterhin der Einfluß von Zink auf die Spermienfunktionen untersucht werden.

Abschließend sollte das Gesamt-Proteom humaner Spermien dargestellt werden und Untersuchungen des Proteoms von motilen und immotilen Spermien sollten zeigen, ob in den beiden Populationen unterschiedlich exprimierte Proteine existieren. Diese sollten daraufhin anhand von MALDI-TOF Untersuchungen identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft der Spermien

Die in dieser Arbeit verwendeten Spermien wurden vom internistischen Labor Dr. Hector der Endokrinologischen Gemeinschaftspraxis Breustedt, Schulte & Partner GbR (Hamburg-Altona), klassifiziert und zur Verfügung gestellt oder von Freiwilligen gespendet und unter dem Lichtmikroskop auf Reinheit und Motilität überprüft.

2.2 Reinigung der Spermien („Swim-Up“)

Material

MEM/ HEPES

9,6 g MEM (Gibco)
5,96 g HEPES (Serva, Heidelberg)
ad 1l
pH 7,4 -7,45 mit NaOH einstellen

SWIM-UP MEDIUM

MEM/HEPES
4% BSA (Merck, Darmstadt)

IBMX Sigma, Steinheim

Die in dieser Arbeit verwendeten Spermien wurden von gesunden Spendern nach mindestens 48 Stunden Abstinenz gewonnen. Die Spermien wurden nach den Empfehlungen der WHO (WHO Handbuch zur Laboruntersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermatozoen-Zervikalschleim-Interaktion, Schattauer, 1988) als motil oder immotil eingestuft. Nach mindestens 30 Minuten Liquefaktion wurden je 0,5 ml Ejakulat mit 1,5 ml Minimal Essential Medium (MEM) / HEPES pH 7,4 versetzt und bei 600g 15 Minuten zentrifugiert.

Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde die sogenannte „Swim-Up“-Prozedur durchgeführt, bei der progressiv-motile Spermien von nicht-motilen getrennt werden. Hierzu wurde nach der ersten Zentrifugation das Medium abgezogen und das Spermienpellet mit 0,5ml Swim-Up-Medium versetzt und 1,5 Stunden im Wasserbad

bei 37° C inkubiert. Bei dieser Methode schwimmen motile Spermien in das Medium auf, während immotile Spermien, unreife Keimzellen und andere Zellen wie Makrophagen und Leukozyten im Pellet (Bottom-Fraktion) verbleiben. Der Überstand (Swim-Up-Fraktion) mit den motilen Spermien wird abgezogen und bei 400g 15 Minuten zentrifugiert. Daraufhin folgen zwei Waschschriffe, um das Bovine Serum Albumin ganz zu entfernen, bevor die Spermien in einer Neubauer-Zählkammer gezählt wurden. Ist in den Versuchen die Bottom-Fraktion verwendet worden, so wurde vorher durch mikroskopische Begutachtung eine mind. 90% Reinheit der Spermien vorausgesetzt, d.h. es sollten keine unreifen Keimzellen oder andere Zellen wie Makrophagen und Leukozyten, welche auf eine Infektion schliessen ließen, in der Fraktion zu sehen sein.

Spermien, die in den Versuchen als „immotil aber vital“ bezeichnet werden, wurden im Labor von Dr. med. Hector mit dem Eosin/Nigrosin Test auf ihre Vitalität überprüft. Alle Stimulationsversuche mit lebenden Spermien wurden bei 36°C im Wasserbad in MEM/HEPES pH 7.4 durchgeführt, immer in Anwesenheit von 0,01% BSA und 5mM IBMX. Die Konzentrationen, die Zeitdauer und die einzelnen Substanzen zur Stimulation sind im jeweiligen Versuch aufgeführt.

2.3 Kultivierung und von MA-10 – Zellen

Material

Alle Reagenzien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von Sigma, Steinheim

KULTURMEDIUM

DMEM und F12-Medium (Dulbecco,) 1:1 mischen

7,5% Pferdeserum

2,5% Fötale Kälberserum

2% Penicillin/Streptomycin

1% Glutamin

0,1% BSA

MA-10 Zellen sind eine Maus-Tumor-Leydigzelllinie, welche uns freundlicherweise von Prof. Mario Ascoli (University of Iowa, Iowa, USA), zur Verfügung gestellt wurde.

Diese Zellen wurden bis zur Konfluidität in Medium kultiviert. Zur Herstellung der Homogenate wurden die Zellen mit einem Zellscraper abgekratzt und bei 100 g 10 min pelletiert.

2.4 Herstellung von Homogenaten

Material

Alle Reagenzien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von MERCK (Darmstadt)

HOMOGENISIERUNGSPUFFER II

10 mM Tris

5 mM EDTA

1% TritonX-100

pH 7,5

Mikrodismembrator (Braun Biotech International, Melsungen)

Glasperlen, 1mm (Braun Biotech International, Melsungen)

PBS (Instamed, Biochrom KG, Berlin)

Die Herstellung von Spermien-Homogenaten wurde wie folgt durchgeführt: Nach der Reinigung wurden die Spermien bei 5000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge 2 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgezogen und das Pellet auf Trockeneis gefroren. Dann wurde das Pellet mit 1 Spatelspitze silikonisierter Glasperlen 1.5 min bei 2000 rpm homogenisiert. Daraufhin wurden die Spermien mit 60µl Homogenisierungspuffer II/10Mio Spermien versetzt und nochmals bei 2000 rpm 1.5 min homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde kurz zentrifugiert und in ein Eppendorf-Tube überführt um das Homogenat von den Glasperlen zu entfernen. Das Homogenat wurde daraufhin 2 min bei 10.000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand wurde einer Proteinbestimmung unterzogen oder das Gesamthomogenat wurde weiter fraktioniert (s. 2.5).

Zur Herstellung von MA-10-Zell-Homogenaten wurden die Zellen nach dem Abkratzen aus den Zellkulturflaschen bei 1500 g 15 min lang zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde 2x in PBS gewaschen. Das Pellet wurde in

Homogenisierungspuffer II resuspendiert und in einem Douncer mit 20 Schüben homogenisiert. Die Probe wurde 2 min bei 10.000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Dann erfolgte die Proteinbestimmung.

Zur Herstellung von Gewebehomogenaten wurden die Gewebe in Stickstoff schockgefroren und danach auf einer Metallplatte mit Aluminiumfolie umwickelt mit einem Gummihammer zerkleinert. Die entstandenen Bruchstücke wurden in einen mit Stickstoff gekühlten Mörser gegeben und weiter zerkleinert. War das Gewebe genügend zerkleinert, wurde das Pulver (Stickstoff-gekühlt) in einen Douncer gegeben und im Homogenisierungspuffer II mit 20 Schüben homogenisiert. Dieses Homogenat wurde ebenfalls erst bei 10.000 rpm 2 min zentrifugiert, bevor es einer Proteinbestimmung oder einer weiteren Fraktionierung unterzogen wurde.

2.5 Gewinnung von Partikulären- und Cytosolfractionen

Zur Gewinnung der partikulären oder cytosolischen Fraktionen der Homogenate wurden die Homogenate in Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und gekühlt bei 100.000g für 40 min in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der entstandene Überstand ist die cytosolische Fraktion. Das Pellet wurde mit Homogenisierungspuffer II resuspendiert und stellt die partikuläre Fraktion dar, in der auch die Membranen der Zellorganellen enthalten sind.

2.6 Proteinbestimmung

Material

Ovalbumin (Sigma, Steinheim)

Mikrotiterplatten, 96-well (Nunc)

Proteinfärbe-Reagenz, Bio Rad Protein Assay, Dye Reagent-Konzentrat, Bio Rad, München)

0,5 M NaOH

ELSIA-Reader (SLB-Instruments, Easy Fit).

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Hierzu wurde ein Standard von 0, 4, 8, 12 und 16 µg Ovalbumin eingesetzt. Von den vorher angesetzten Standards wurden eingefrorene Aliquots

aufgetaut und je 100 µl Standards mit 100 µl 0,5 M NaOH und 600 µl H₂O versetzt. Von den Proben-Homogenaten wurden je nach vermuteter Konzentration 5-10 µg mit 100 µl 0,5 M NaOH und 700 µl H₂O versetzt. Alle Proben und Standards wurden daraufhin mit 200 µl Proteinfärbe-Reagenz versetzt und vorsichtig gevortext. Je 350 µl der Standards und Proben wurde dann auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und die entstandene Färbung bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen

2.7 SDS-PAGE (1-dimensionale Gelelektrophorese)

Material

GELPUFFER für Tris-Tricin-System

3 M Tris

0,3% SDS (w/v)

pH 8,6

1,5 M TRIS

363,42 g Tris

ad 2 l

ANODENPUFFER

665 ml 1.5 M Tris

ad 5 l

pH 8,9

KATHODENPUFFER

0,1 M Tris

10% SDS (w/v)

0,1 M Tricin

pH stellt sich von selbst ein (ca. pH 10,4)

4x Probenpuffer, Roti-Load (Roth, Karlsruhe)

Die Gele wurden nach dem Tris-Tricin-System gegossen und wiesen, sofern nicht anders vermerkt, eine Konzentration von 8% auf und hatten die Dimension 150x180x1 mm.

Das Rezept für 8% Gele lautet wie folgt (Trenngel) :

Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	5 ml
Gelpuffer	10 ml
Glycerol	4 g
H ₂ O	11 ml
TEMED	35 µl
10% Ammoniumpersulfat (APS)	150 µl

4% Sammelgel:

Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	1 ml
Gelpuffer	3,1 ml
H ₂ O	11 ml
TEMED	35 µl
10% APS	150 µl

Die Proben, die jeweils entweder die gleiche Anzahl an Spermien oder die gleiche Konzentration an Protein aufwiesen, wurden mit 4x Probenpuffer versetzt und 5 Minuten im Wasserbad aufgekocht, bevor sie in die Taschen des Gels aufgetragen wurden. Dann wurde das Gel bei 50V über Nacht laufen gelassen.

2.8 Western Blot

Material

10xTBS

1,37 M NaCl

200 mM Tris

pH 7,4

TBS-T

500 ml 10x TBS

2,5 ml Tween 20

ad 5l

KATHODENPUFFER für Semi-Dry-Blot

25 mM Tris

40 mM 6-Aminocapronsäure

200 ml/l Methanol

pH stellt sich ein

ANODENPUFFER 1 für Semi-Dry-Blot

30 mM Tris

200 ml/l Methanol

pH stellt sich ein

ANODENPUFFER 2 für Semi-Dry-Blot

300 mM Tris

200 ml/l Methanol

pH stellt sich ein

BOEHRINGER-BLOCKIERUNGSPUFFER (Standard-Blockierungspuffer)

100 mM Maleinsäure

150 mM NaCl

1% (w/v) Boehringer Blocking reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

1 ml/l 5% Thimerosal nach Lösen des Blocking Reagents hinzugeben

pH 7,5

TROPIX-BLOCKIERUNGSPUFFER (für GSK-3 Immunoblots)

0,2% (w/v) I-Block Reagenz (Tropix, Bedford, MA, USA)

10% (v/v) 10x TBS

1 ml/l Tween 20

1 ml/l 5% Thimerosal

Filterpapier 3MM (Whatman)
PVDF-Membran (Millipore, Eschborn)
Semi-Dry Blotter (Phase, Lübeck)
ECL-Reagenz (Pierce, Rockford, IL, USA)
Röntgenfilme (Fuji RX Super)
Röntgenfilmentwickler (Hyper processor, Amersham Pharmacia, Freiburg)

Beim Western Blot werden die Proteine, welche vorher elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt wurden, per Elektrotransfer auf eine Membran geblottet. Hierbei wurde das Semi Dry Blot Verfahren benutzt. Dabei wurden 3 Lagen Filterpapier in Kathodenpuffer getränkt und auf die Kathode gelegt. Dann wurde das Gel aufgelegt, gefolgt von der kurz zuvor in Methanol getränkten Membran und je 3 weiteren Lagen Filterpapier in Anodenpuffer 1 und Anodenpuffer 2 getränkt, bevor die Apparatur durch Aufsetzen der Anode geschlossen wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den Lagen keine Luftblasen bildeten. Dann erfolgte die sogenannte „Blockierung“ der Membran mit einem für die nachfolgende Immunreaktion optimalen Blockierungspuffer (Boehringer-Blockierungspuffer oder Tropix-Blockierungspuffer für die GSK-3- Immunreaktionen) für 1 Stunde oder über Nacht im Kühlraum um unspezifische Bindungen der später auf die Membran gebrachten Antikörper so weit wie möglich zu reduzieren. Auf diese Blockierung folgt eine Inkubation mit dem primären Antikörper gegen das gesuchte Protein wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Um den nicht gebundenen Anteil an primärem Antikörper zu entfernen, folgt auf diese Inkubation ein Waschschrift in TBS-T Puffer. Als nächstes wird die Membran für 1 Stunde mit einem HRP (Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert und anschließend 4x 15 Minuten mit TBS-T gewaschen, um alle nicht gebundenen Antikörper-Moleküle zu entfernen.

Um die gebundenen Antikörperkomplexe auf der Membran sichtbar zu machen, wird nun bei der Enhanced Chemilumineszenz Reaktion (ECL) das Substrat des an den zweiten Antikörper gekoppelten Enzyms (H_2O_2) hinzugegeben. Bei der Reaktion entsteht Licht, welches ein deutliches Signal auf einem auf die Membran gelegten Röntgenfilm hinterläßt. Der Film wird dann maschinell entwickelt.

Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

4G10 (pTyr)	(Upstate, Lake Placid, NY, USA), monoklonal, Maus
GSK-3α/β	(phosphorylation-state independent, New England Biolabs, Beverly, MA, USA) polyklonal, Kaninchen
GSK-3α/β, an Ser-21/9 phosphoryliert	(New England Biolabs, Beverly, MA, USA) polyklonal, Kaninchen
GSK-3β, an Ser-9 phosphoryliert	(Chemicon, Temecula, CA, USA) polyklonal, Kaninchen
PI3-Kinase	(85 kDa Untereinheit, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) polyklonal, Kaninchen
PKB/Akt	(New England Biolabs, Beverly, MA, USA) polyklonal, Kaninchen
ILK	(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) polyklonal, Kaninchen
PP2A/A	(Calbiochem La Jolla, CA, USA) polyklonal, Kaninchen
PP2A/Bα	(Calbiochem La Jolla, CA, USA) polyklonal, Kaninchen
β-Catenin	(Cell Signaling Technology, Frankfurt) polyklonal, Kaninchen

Sekundäre Antikörper

Anti-mouse IgG	(H+L), Jackson immunoresearch Laboratories, Dianova, Hamburg
Anti-rabbit IgG	(Fc-Specific), Jackson immunoresearch Laboratories, Dianova, Hamburg

2.8.1 Ponceau-Färbung der Blots

Material

PONCEAU-LÖSUNG

Ponceau-S-Konzentrat (Sigma, Steinheim) 20 ml in 80 ml H₂O

Methanol (Merck, Darmstadt)

Nach dem Elektroblothing wurde die Membran zur Überprüfung des Erfolges des Elektrotransfers und des Auftrages gleicher Mengen Protein in Ponceau S-Lösung 1 min inkubiert. Dann wurde die Membran so lange in H₂O gewaschen, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Daraufhin wurde sie fotokopiert und kurz in Methanol gewaschen, bevor eine weitere Behandlung erfolgte.

2.9 Enzym-Assays

2.9.1 Adenylatzyklase-Assay

Material

Alle verwendeten Reagenzien stammen, sofern nicht anders vermerkt, von Sigma (Steinheim)

HOMOGENISIERUNGSPUFFER I

10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5

1 Tablette Proteasehemmer Complete ad 50 ml (Boehringer, Mannheim)

AC-MIX

1 mM ATP

5 mM MgCl₂

1 mM EDTA

0,5mM IBMX

1 mM DTT

40 mM Tris-HCl pH 7,5

Die Protein-Homogenate wurden in einer Konzentration von 10 µg in das Assay eingesetzt. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl im AC-Mix für 30 min bei 32°C im Wasserbad inkubiert. Da die Adenylatzyklase abhängig von divalenten Kationen ist, gehört zur Standard-Inkubation 5 mM MgCl₂ in den AC-Mix, sollte der Einfluss anderer Ionen getestet werden, so wurde dieses z.B. durch 5 mM MnCl₂

ersetzt. Die jeweiligen Konzentrationen der Stimulanzen werden in den einzelnen Versuchen angegeben.

2.9.2 Guanylatzyklase-Assay

Material

GC-MIX I:

- A: 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5
10 mM DTT
- B: 10 mg/ml BSA
- C: 5 mM IBMX
- D: 100 mM Kreatin-Phosphat
- E: 3500 U Kreatin-Phosphokinase
0,1% BSA

A, B, C, D, E zu gleichen Teilen mischen

Die Protein-Homogenate wurden auch hier in einer Konzentration von 10 µg in das Assay eingesetzt. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl im GC-Mix II, welcher sich aus 100 µl GC-Mix I, 0,2 mM EGTA, und 1 mM GTP zusammensetzte, für 30 min bei 32°C im Wasserbad inkubiert. Da auch die Guanylatzyklase von divalenten Kationen abhängig ist, gehört in den GC-Mix 5 mM MgCl₂ zur Standardinkubation. Wurde die Ionenabhängigkeit getestet, wurde MgCl₂ durch das jeweilige andere Kationen ersetzt. Die jeweiligen Konzentrationen der Stimulanzen werden in den jeweiligen Versuchen vermerkt.

2.10 Bestimmung der cAMP- und cGMP-Konzentrationen

2.10.1 cAMP-ELISA und cGMP-ELISA mit Acetylierung

Der Meßbereich für den cAMP-ELISA liegt zwischen 2 und 486 fmol/ 50µl.

Der Meßbereich für den cGMP-ELISA mit Acetylierung liegt zwischen 0,3 und 81 fmol/ 50µl.

Material

Alle Reagenzien stammen, mit Ausnahme der Antikörper und soweit nicht anders vermerkt, von Merck, Darmstadt

ACETYLIERUNGSREAGENZ

1 ml Essigsäureanhydrid (Sigma, Steinheim)

2 ml Triethylamid (Sigma, Steinheim)

E-PBS-Puffer

0,1 M Natriumphosphat

0,15 M Natriumchlorid

0,005 M EDTA

0,2 % BSA

0,01% Thimerosal (Sigma, Steinheim)

pH 7,0

cGMP-Antiserum

(Antikörper 39, lot 32): 1:1600 in EPBS-Puffer + 0,0005% Metanilgelb

cGMP-Tracer (Biotin):

170 fmol/mL in E-PBS-Puffer+ 0,0005% Bromphenolblau

cAMP-Antiserum

cAMP-Tracer

Immunomodule

Nunc 469949 beschichtet mit Goat Anti Rabbit

Gamma- Globulin.

Rahmen/ Deckel

Nunc 460348/ NUNC 263339

TMB-Substratlösung (Neogen Corp, Lexington, KY, USA)

Testprinzip

Die Methode dieser beiden ELISAs beruht auf einem kompetitiven Doppelantikörper Enzymimmunoassay mit Solid-Phase Technik. Die immunologische Reaktion findet an den mit Goat-anti-rabbit-Antikörpern beschichteten Wells der Immunmodule statt. Der Ablauf der Reaktionen läßt sich in folgende Abschnitte unterteilen:

- (i) Erstantikörper-Reaktion. Hierbei konkurrieren das cAMP/cGMP aus der Probe und ein cAMP/cGMP-Biotin-Derivat (Tracer) um die Bindung an den cAMP- oder cGMP-Antikörper. Die entstehenden cAMP sowie cAMP-Biotin-, bzw. cGMP sowie cGMP-Biotin-Antikörperkomplexe werden zugleich über den zweiten Antikörper (goat anti-rabbit) an die Wells gebunden.
- (ii) HRP-Streptavidin-Inkubation. In diesem Reaktionsschritt wird an Streptavidin gebundene HRP zugegeben, welche nur von dem cAMP/cGMP-Biotin-Antikörperkomplex gebunden wird.
- (iii) HRP-Substrat-Inkubation. Das farblose Substrat Tetramethylbenzidin wird von der an die Wells gebundene HRP zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, der nach Zugabe von H_2SO_4 gelb wird. Die Intensität der Farbe ist abhängig von der Enzymkonzentration und damit umgekehrt proportional zu gesuchten cAMP/cGMP-Konzentration und wird im ELISA-Reader bei 450 nm vermessen.

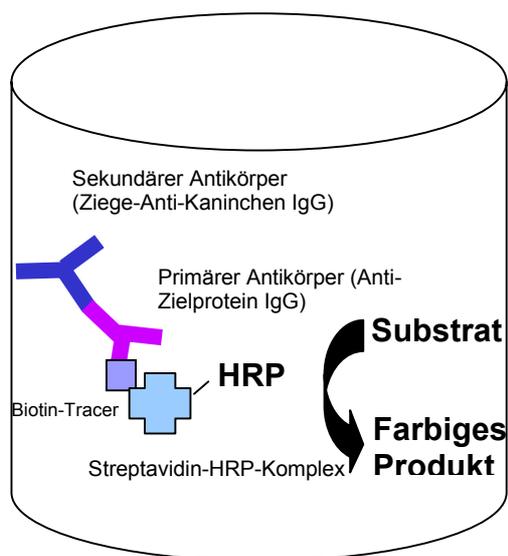


Abb. 8 Funktionsprinzip des cAMP/cGMP-ELISA.

Durchführung der cAMP- und cGMP-ELISA

Im Falle der Bestimmung der basalen cGMP-Spiegel wurden 5 Millionen Spermien pro Ansatz so mit MEM/HEPES versetzt, dass sich ein Gesamtvolumen von 450 µl ergab. Dann wurden die Proben mit 2 ml 100% Ethanol versetzt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert, um eine Proteinfällung vorzunehmen. Sollte eine Stimulation der Adenylatzyklase-Aktivität oder Guanylatzyklase-Aktivität durch verschiedene Substanzen untersucht werden, wurden 5 Millionen Spermien pro Ansatz mit verschiedenen Konzentrationen dieser in Stimulationsmedium bei einem Gesamtvolumen von 450 µl bei 36°C im Wasserbad für 1.5 h inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben mit 2 ml 100% Ethanol versetzt. Die Behandlung der Proben am nächsten Tag war unabhängig vom Versuchsaufbau. Zunächst wurden die Proben bei 1000 g 30 min zentrifugiert und der Überstand in Glasröhrchen überführt. Daraufhin erfolgte eine Vakuumextraktion im Evaporator. Das Pellet wurde mit 200 µl MEM/HEPES + Na-Azid rückgelöst. Um eine größere Sensitivität des ELISA zu erhalten, wurden die Proben mit 10 µl Acetylierungsreagenz versetzt und sofort gut gevortext.

Dann werden je 50 µl Probe/Standard in die Wells eines zuvor mit E-PBS-Puffer gewaschenen Immunomoduls pipettiert. Daraufhin wurde in jedes Well 100 µl Antiserum (primärer Antikörper) und 50 µl Biotin-Tracer pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 18-24 h bei 4°C im Dunkeln und in einer H₂O-gesättigten Kammer. Generell wurde folgendes Pipettierschema genutzt:

Well	Standard	Probe	Medium	Puffer	1.AK	Tracer	Total
NSB	-	-	50 µl	100 µl	-	50 µl	200 µl
B ₀	-	-	50 µl	-	100 µl	50 µl	200 µl
Standard	50 µl	-	-	-	100 µl	50 µl	200 µl
Probe	-	50 µl	-	-	100 µl	50 µl	200 µl

Am folgenden Tag wurden die Immunomodule ausgeschüttet und auf Zellstoff wurde die noch vorhandene Flüssigkeit ausgeklopft. Daraufhin wurden die HRP-Streptavidin-Lösung in kaltem E-PBS-Puffer angesetzt und auf Eis gestellt. Je 200 µl dieser eiskalten HRP-Streptavidin-Lösung wurden in jedes Well pipettiert und eine Inkubation von 1 h wurde angeschlossen. Nach dieser Inkubation wurden die Platte

wieder gut ausgeklopft. 375 µl eiskalten E-PBS-Puffer wurden in jedes Well pipettiert und für eine Minute inkubiert. Dieser Waschschritt wurde noch 3 x wiederholt, wobei die Pipettierichtung jeweils gewechselt wurde. Nach dem Waschen ließ man die Platte eine Minute über Kopf gut abtropfen, bevor die gewaschene Platte 5 min bei Raumtemperatur temperiert wurde. Anschließend wurden in jedes Well 200 µl fertige TMB-Substratlösung hinzugegeben und eine Inkubation von 60 Minuten bei Raumtemperatur, Dunkelheit in einer H₂O gesättigten Kammer angeschlossen. Die Substratinkubation wurde durch Zusatz von 50 µl 2M H₂SO₄, welche zügig und unter Vermeidung von grellem Licht pipettiert wurde, gestoppt. Die Messung des ELISA erfolgte dann bei 450 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte per Computer („Easy FIT, SLT-Labinstruments, Prism 3.0 Graph-Pad Software).

Hierbei wurde von der Software der Wert für die nicht-spezifische Bindung (NSB) von allen Meßwerten abgezogen (OD_B-OD_{NSB}). Dann wurden die NSB-korrigierten OD-Werte der Standards und Proben (B) durch den NSB-korrigierten Nullstandard dividiert und der Quotient B/ B₀ in Prozent nach folgender Gleichung ermittelt:

$$B/B_0 (\%) = \frac{OD_{\text{Standard/Probe (B)}} - OD_{\text{NSB}}}{OD_{\text{Nullstandard (B0)}} - OD} \times 100$$

Diese linearen Extinktionswerte der Standards wurden gegen die logarithmische Konzentration der Standards als Graph dargestellt.

2.10.2 cAMP-FIA

Der Meßbereich des cAMP-FIAs liegt zwischen 2 und 486 fmol/ 50µl

Material

Immunomodule

FluoroNunc™ Module (incl. Rahmen)

Nunc 437915, beschichtet mit Goat-anti-rabbit Gamma-Globulin.

Deckel

Nunc 263339

E-PBS-Puffer siehe 3.3.1

cAMP-Antiserum

Affinitätsgereinigtes Antiserum (MS1, rabbit)

Pool 6-25, 1:300 in E-PBS +0,0005% Methylorange

cAMP-DTPA-Eu³⁺ (Tracer)

Lyophilisiertes Stock wird mit Tracer-Puffer

auf ca 50.000 cps/50µl eingestellt.

TRACER-PUFFER

0,1 M Tris/ HCl

0,1% Natrium Azid

0,9% Natrium Chlorid

0,01% Tween 20

0,1% BSA (Stabilizer, Wallac)

pH 7,5

Prinzip

Auch die Methode dieses Fluoro-Immunoassays beruht auf einem kompetitiven Doppelantikörper Immunoassay. Die immunologische Reaktion findet an den mit Goat-anti-rabbit-Antikörpern beschichteten Wells der Immunomodule statt. Der Ablauf der Reaktionen läßt sich in folgende Abschnitte unterteilen:

- (i) Erstantikörper-Reaktion. Hierbei konkurrieren das cAMP aus der Probe und ein cAMP-Europium³⁺-Chelat (Tracer) um die Bindung an den cAMP-Antikörper.
- (ii) Durch ausgiebiges Waschen wird der Anteil an ungebundenem cAMP-Eu³⁺-Tracer entfernt
- (iii) Dissoziation/Verstärkung. Die saure Verstärker-Lösung (Enhancement

solution) dissoziiert des Eu^{3+} vom gebundenen, nicht-fluoreszierenden Tracer-Chelat. Das freigesetzte Eu^{3+} formt schnell einen neuen, stabilen Komplex mit Komponenten aus der Enhancement Solution.

(iv) Messung der Fluoreszenz

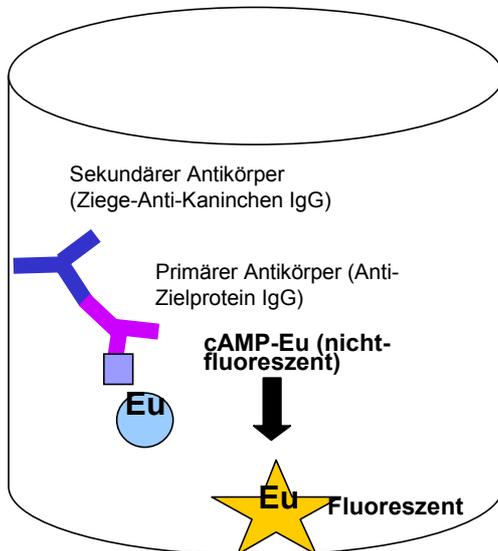


Abb. 9 Funktionsprinzip des cAMP-FIA

Durchführung des cAMP-FIA

Die Probenaufarbeitung zur Bestimmung der basalen cAMP-Spiegel in humanen Spermien erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Die FIA-Platte wird vor Beginn des Assays gut in einem ELISA-Wascher mit 300 μl E-PBS-Puffer pro Well gewaschen. Da im Staub Europium vorhanden sein kann, welches die Probenergebnisse verfälschen würde, wird die Platte gleich nach dem Waschen wieder mit dem Deckel versehen.

Je 200 μl und Probe und Standards werden mit je 10 μl Acetylierungsreagenz aus einem Teil Essigsäureanhydrid und zwei Teilen Triethylamin versetzt und sofort gut gemischt. Dann werden je 50 μl Probe/Standard in die Wells pipettiert. Daraufhin wurde in jedes Well 100 μl Antiserum (primärer Antikörper) und 50 μl Europium-Tracer pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 18-24 h bei 4°C im Dunkeln und in einer H_2O -gesättigten Kammer. Generell wurde folgendes Pipettierschema genutzt:

Well	Standard	Probe	Medium	Puffer	1.AK	Tracer	Total
NSB	-	-	50 µl	100 µl	-	50 µl	200 µl
B ₀	-	-	50 µl	-	100 µl	50 µl	200 µl
Standard	50 µl	-	-	-	100 µl	50 µl	200 µl
Probe	-	50 µl	-	-	100 µl	50 µl	200 µl

Nach der Inkubation wurde am folgenden Tag die Platte erneut im Washer mit je 300 µl kaltem E-PBS-Puffer 4x gewaschen und kurz auf Zellstoff gut ausgeklopft. Daraufhin wurden in jedes Well 200µl Enhancer-Lösung pipettiert, die Platte wieder mit ihrem Deckel versehen und mindestens eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurde die Fluoreszenz gemessen (Anregung: 340 nm und Emission: 615 nm).

Die Auswertung der Daten erfolgte per Computer („Easy FIT“, SLT-Labinstruments, Prism 3.0 Graph-Pad Software) wie unter 2.10.1 beschrieben, aber statt der optischen Dichte werden hier counts per second (cps) ermittelt.

Diese linearen cps-Werte der Standards wurden dann gegen die logarithmische Konzentration der Standards als Graph dargestellt.

2.10.3 cGMP-ELISA

Der Meßbereich dieses ELISA liegt zwischen 7 und 1701 fmol/ 50µl.

Das Testprinzip ist mit dem unter 2.6.1 für cGMP und cAMP-ELISA mit Acetylierung identisch. Auch die Durchführung von der Stimulation der Proben bis zum Pipettierschema ist nahezu identisch, aber dieser Test ist weniger sensitiv, da die Proben nicht Acetyliert werden, bevor sie in das ELISA eingesetzt werden.

2.11 Proteomics

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde von P.H. O'Farrell und J. Klose 1975 eingeführt. In der ersten Dimension werden die Proteine einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen, in der zweiten Dimension wie gewohnt per SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt.

2.11.1 Isoelektrische Fokussierung

Material

Alle Reagenzien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von Sigma, Steinheim

PROBENPUFFER für isoelektrische Fokussierung

8 M Harnstoff (Roth, Karlsruhe)

2% (w/v) CHAPS

0,5% (v/v) IPG-Puffer (Amersham-Pharmacia, Freiburg)

Bromphenolblau (einige Körnchen, bis sich Lösung ausreichend blau färbt)

Frisch vor Gebrauch 18,2 µl 1 M DTT hinzugeben

ÄQUILIBRIERUNGSPUFFER 1

1.5 M Tris/HCl pH 8.8 (Merck, Darmstadt)

6 M Harnstoff

30% (v/v) Glycerol (Merck, Darmstadt)

2% (w/v) SDS

Bromphenolblau (einige Körnchen, bis sich Lösung ausreichend blau färbt)

Frisch vor Gebrauch 100 mg DTT/ 10ml hinzufügen

ÄQUILIBRIERUNGSPUFFER 2

1.5 M Tris/HCl pH 8.8

6 M Harnstoff

30% (v/v) Glycerol

2% (w/v) SDS

Bromphenolblau

Frisch vor Gebrauch 100 mg Iodacetamid/ 10ml hinzufügen

IGPhor, Fokussiergerät, (Amersham-Pharmacia, Freiburg)

IPG-Strips pH 3-10, 4-7 und 6-9 (Amersham-Pharmacia, Freiburg)

Dry-Strip Cover Fluid (Amersham-Pharmacia, Freiburg)

Prinzip

Proteine sind ihrer Natur nach amphoterische Moleküle. Sie tragen entweder positive, negative oder neutrale Ladungen, je nach dem pH-Wert ihrer Umgebung. Die Nettoladung eines Proteins entspricht der Summe aller negativen und positiven Ladungen der Aminosäureseitenketten sowie der N- und C-Termini. Der isoelektrische Punkt ist der spezifische pH-Wert, an welchem die Nettoladung des Proteins Null ist. Dabei sind die Proteine bei pH-Werten unter ihrem isoelektrischen Punkt (pI) positiv geladen, bei pH- Werten über ihrem pI sind sie dagegen negativ geladen.

In einem elektrischen Feld wandern Proteine in einer Lösung oder einem immobilisierten pH-Gradienten bis zu der Stelle, die ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, ihre Nettoladung also gleich null ist. Ein Protein mit einer positiven Ladung wandert dabei zur Kathode, wobei die Nettoladung kontinuierlich während der Wanderung durch den pH Gradienten abnimmt, bis das Protein seinen pI erreicht hat. Ein Protein mit einer negativen Ladung wandert dagegen entgegen der Anode. Sollte ein Protein vom pI weg migrieren, wird es sofort geladen und muß sich wieder in Richtung des pI 's bewegen. Dieser fokussierende Effekt der IEF, welcher Proteine an ihrem pI konzentriert, erlaubt es, Proteine mit nur geringen Ladungsdifferenzen zu trennen.

Die isoelektrische Fokussierung unter denaturierenden Bedingungen erlaubt die höchste Auflösung und sauberste Ergebnisse.

Durchführung

Die Homogenate wurden in einer Konzentration von 200 μg pro 450 μl Gesamtvolumen für 24 cm-Strips in dem jeweiligen pH-Gradienten (pH 3-10, pH 4-7

oder pH 6-9) entsprechenden Probenpuffer aufgenommen und gleichmäßig in dem 24cm-Stripholder verteilt. Dann wurde der Gelstrip mit dem Gel nach unten auf die Probe gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Gel beide Elektroden berührt. Daraufhin wird der Gelstrip mit Cover Fluid überschichtet, um ein Trocknen der Probe zu verhindern. Die Stripholder wurden dann so auf die IPGphor gelegt, dass sie die Elektroden berühren und die Proben wurden dann nach folgendem Programm fokussiert:

pH-Gradient 3-10

Rehydrierung 12 hrs, 20°C, 50 µA max

Schritt 1: 500 V 1 h oder 500 Vhrs

Schritt 2: 1000 V 1 h oder 1000 Vhrs

Schritt 3: 8000 V 7.5 h oder 60000 Vhrs

pH-Gradient 4-7

Rehydrierung 12 hrs, 20°C, 50 µA max

Schritt1: 500V 1 h oder 500 Vhrs

Schritt 2: 1000 V 1 h oder 1000 Vhrs

Schritt 3: 8000 V 9.5 h oder 72.000 Vhrs

pH-Gradient 6-9

Rehydrierung 12 hrs, 20°C, 50µA max

Schritt 1: 500 V 1 h oder 500 Vhrs

Schritt 2: 1000 V 1 h oder 1000 Vhrs

Schritt 3: 5000 V 13 hrs oder 65.000 Vhrs

Nach der erfolgten Fokussierung wurden die Strips entweder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren oder direkt für 15 min im Äquilibrationpuffer I für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine 15 Minuten-Inkubation im Äquilibrationpuffer II. Erst nach diesen beiden Inkubationsschritten erfolgt der Auftrag auf die 2. Dimension.

2.11.2 2. Dimension (SDS-PAGE)

Material

Alle Reagenzien haben die gleiche Herkunft wie unter 2.11.1 beschrieben

GELPUFFER nach Laemmli (14 x12,5% Gel)

AA/BAA 29:1, 40%	281 ml
1,5 M Tris pH 8,8	225 ml
10% SDS	9 ml
H ₂ O	385 ml

+ 3,3 ml 10% APS

0,6 ml TEMED

VERDRÄNGUNGS-LÖSUNG

1,5 M Tris pH 8,8	25 ml
Glycerol	50 ml
H ₂ O	25 ml
Bromphenolblau	2 mg

5x LAUFPUFFER

Tris	75,5 g
Glycin	360,5 g
SDS	25 g (0,1%)
Ad 5L	

GEL-AUFBEWAHRUNGS-LÖSUNG

1,5 M Tris pH 8,8	250 ml
10% SDS	10 ml
H ₂ O	740 ml

Agarose

Ettan-Dalt II, Gelgießstand und Gellauf-System, Amersham-Pharmacia, Freiburg

Rainbow-Molecular-Gewichts-Marker 14-220 kDa (Amersham-Pharmacia, Freiburg)

Die Gele in der 2. Dimension entsprachen dem Laemmli-System (Laemmli, 1970) und wiesen eine Konzentration von 12,5% auf. Die Gele wurden im ETTAN-DALT-System gegossen und laufen gelassen.

Die Strips aus dem Äquilibriumspuffer wurden kurz in Elektrophorese-Laufpuffer getaucht, bevor sie mit dem Plastik an die hintere Gelplatte gelegt und vorsichtig auf die Gelkante gedrückt wurden. Ein kleines Stück Filterpapier (Whatman 3MM) wurde mit 5 µl Marker getränkt und neben den sauren pH-Bereich des Strips auf die Gelkante gelegt. Der Strip und der Marker wurden dann mit 0,5% Agarose luftbalsenfrei überschichtet. Der Lauf der Gele erfolgte dann nach folgenden Schema:

30 min bei 5 W/ Gel

dann 120W, bis die Gele durchgelaufen waren (zu erkennen an der Bromphenolblau-Front).

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele in Fixierlösung gegeben (40% Ethanol, 10% Essigsäure in H₂O) und über Nacht fixiert, bevor eine Silberfärbung durchgeführt wurde.

2.11.3 Alkalische Silberfärbung

Alle Reagenzien stammen von Merck, Darmstadt

Die alkalische Silberfärbung nach Oakely et al. (1980) ist eine der sensitivsten Silberfärbungen. Der Nachteil ist jedoch, dass durch den Einsatz von Glutaraldehyd die Proteine nicht mehr für MALDI-TOF Untersuchungen genutzt werden können. Ohne das Glutaraldehyd ist jedoch der Verlust an Sensitivität immens. Darum wurde diese Färbung eingesetzt, wenn möglichst viele Proteine des Gesamt-Proteoms dargestellt werden sollten.

Fixierung:	40 ml Ethanol	
	10 ml Essigsäure	
	50 ml H ₂ O	1h oder ü.N.

Waschen:	H ₂ O	5 min
Sensitizing 1:	1% Glutaraldehyd	
	0,5 M Natrium-Acetat	30 min
Waschen:	H ₂ O	3x 10 min
Sensitizing2 :	0,05%	
	1,5 Naphthalen Disulfonsäure	60 min
Waschen :	H ₂ O	4x 15 min
Silberreaktion:	0,4 g Silber-Nitrat in 2ml H ₂ O lösen. Diese Lösung langsam zu 10,6 ml H ₂ O + 0,6 ml 25% Ammoniak (Glaspipette!)+ 160 µl NaOH (50%-Lsg) geben. Erst wenn die Lösung klar wird, auf 50 ml auffüllen (wenn nicht klar, mehr Ammoniak hinzugeben)	30 min
Waschen:	H ₂ O	4x4 min
Entwickeln:	0,01% Zitronensäure 0,1% Formaldehyd	
Stop:	5% Tris 2% Essigsäure	

2.11.4 MALDI-kompatible Silberfärbung

Die Silberfärbung, die genutzt wurde, um die Proben hinterher ins MALDI zur Identifizierung zu geben, wurden mit dem Plusone® Silberfärbekit der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Dieses Kit beruht auf der Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988). Damit die Proteinspots nicht irreversibel

modifiziert werden, wurde in dem Sensitizing-Schritt das Glutardialdehyd nicht eingesetzt. Die Färbeprozedur wurde wie folgt durchgeführt:

Fixierung:	100 ml Ethanol 25 ml Eisessig ad 250 ml	30 min oder über Nacht
Sensitizing:	75 ml Ethanol 1.25 ml Natrium Thiosulfat (25%w/v) 17 g Natrium Acetat ad 250 ml	30 min
Waschen:	250 ml Destilliertes H ₂ O	3x 5 min
Silberreaktion:	25 ml Silber Nitrat-Lösung (2,5%w/v) 0,1mL Formaldehyd (37%w/v)* ad 250 ml	20 min
Waschen:	250 ml Destilliertes H ₂ O	2x1 min
Entwicklung:	6.25 g Natrium Carbonat 0.05 ml Formaldehyd (37%w/v)	2-10 min
Stop:	3.65 g EDTA-Na ₂ •2H ₂ O Ad 250 ml	10 min

2.11.5 Picken der Spots

Spots von Interesse wurden aus dem Gel gepickt, indem eine 1000 µl Pipettenspitze etwas abgeschnitten und auf eine Pipette gesteckt wurde. Dann wurde das Gel auf eine feste Unterlage gelegt und der Spot unter einer leichten Drehung und Bedienung der Pipette, als wollte man aufpipettieren, gepickt.

Die gepickten Spots wurden dann in ein Eppendorftube überführt, auf Trockeneis eingefroren und an die Firma Micromass versendet, welche die Spots per MALDI-TOF oder MS/MS-Untersuchung identifizierte.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Adenylatzyklase-Aktivität

Wie in 1.5 bereits beschrieben, basiert sowohl die Initiation der Motilität als auch der Kapazitation auf einer Aktivierung der Adenylatzyklase. Darum wurde in den folgenden Versuchen die Adenylatzyklase-Aktivität in humanen Spermien untersucht. Hierbei wurden Membran- und Cytosolfractionen eingesetzt und nach Proteinfällung das produzierte cAMP mittels ELISA oder FIA gemessen.

Zunächst wurde die Ionenabhängigkeit der humanen Spermien-Adenylatzyklase untersucht.

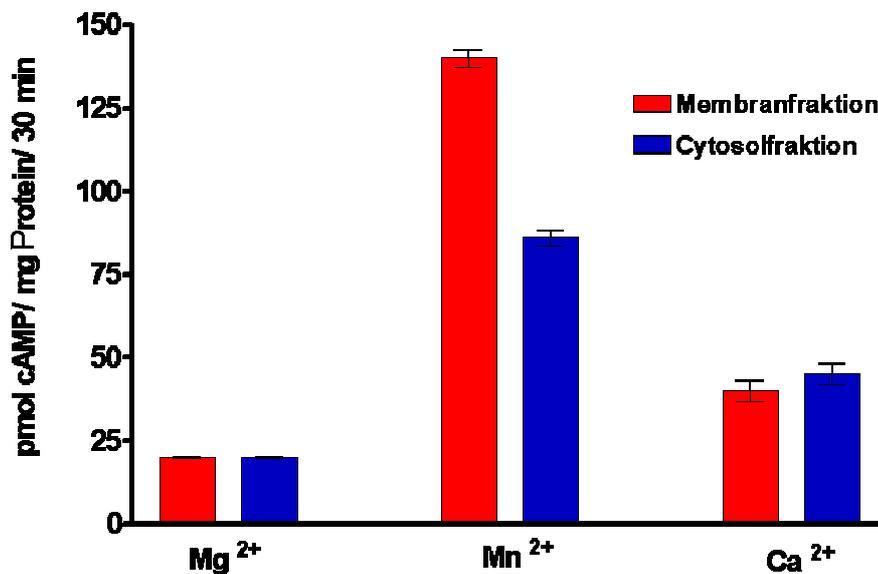


Abb. 10 Ionenabhängigkeit der Adenylatzyklase in humanen Spermien. Spermien wurden in Homogenisierungspuffer I im Mikro-Dismembrator homogenisiert und 40 min bei 100.000g zentrifugiert. Je 10 µg Protein aus Membran- (rot) oder Cytosolfraktion (blau) wurden in das Assay eingesetzt. Das unter Stimulation mit Mg²⁺, Mn²⁺, oder Ca²⁺ für 30 Minuten bei 32° im Wasserbad produzierte cAMP wurde dann per ELISA gemessen

Es zeigte sich, dass die Spermien-Adenylatzyklase durch Mangan in wesentlich stärkerem Maße als durch Magnesium oder Kalzium aktivierbar ist (Abb. 10). Dies galt sowohl für die lösliche Adenylatzyklase (Cytosolfraktion, blau) als auch für die membranständige Adenylatzyklase (Membranfraktion, rot).

Als nächstes wurde die Spermien-Adenylatzyklase-Aktivität im Vergleich mit der Adenylatzyklase-Aktivität aus anderen menschlichen Geweben untersucht. Wie Abb. 11 zeigt, ist die Adenylatzyklase-Aktivität in der Membranfraktion (rot) menschlicher Spermien mit der Aktivität in der Membranfraktion des Hodens vergleichbar. Die Aktivität in der Cytosolfraktion (blau) des Hodens und in beiden Fraktionen des cerebralen Cortex ist jedoch höher. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Adenylatzyklase auch in den Vergleichsgeweben in größerem Maße durch Mangan als durch Magnesium aktivierbar ist.

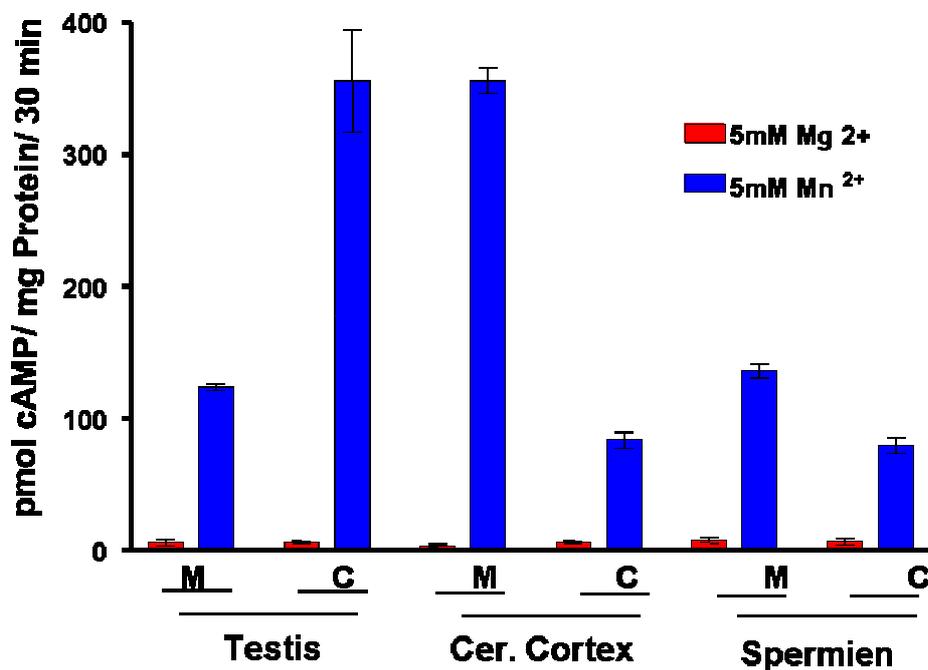


Abb. 11 Vergleich der Adenylatzyklase-Aktivität in humanen Spermien mit der Aktivität in cerebralem Cortex (Cer.Cortex) und humanem Hoden. Je 10µg Protein-Homogenat aus Membran- (M) und Cytosolfraktion (C) wurden für 30 Minuten im Adenylatzyklase-Assay mit je 5mM Magnesium (Mg) oder Mangan (Mn) stimuliert. Das produzierte cAMP wurde dann per cAMP-ELISA bestimmt.

Es ist bekannt, dass die Adenylatzyklase durch divalente Ionen beeinflusst wird. Weitere Untersuchungen sollten nun zeigen, ob Zink seinen Effekt durch Aktivierung der Adenylatzyklase ausüben kann. Es wurden hierzu Untersuchungen in Gesamt-Homogenaten humaner Spermien durchgeführt. Diese Studien zeigten, dass die Adenylatzyklase in humanen Spermien durch Zink in zeit- und konzentrationsabhängiger Weise stimulierbar ist (Abb. 12)

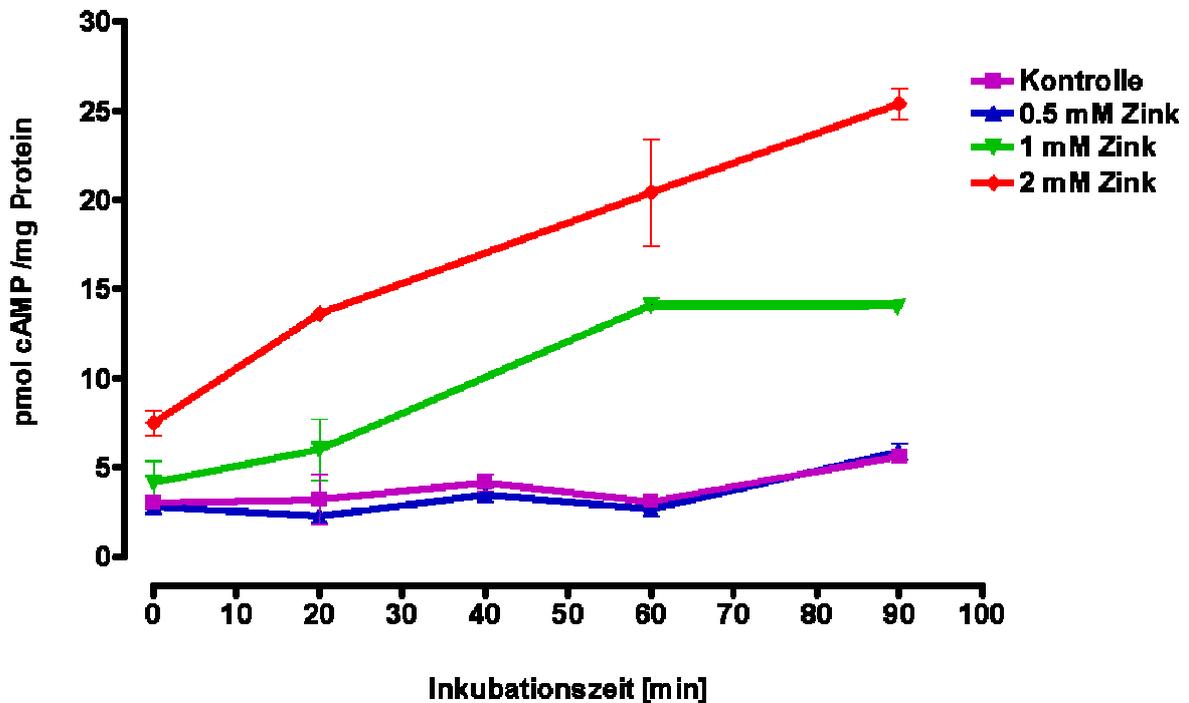


Abb. 12 Zeit- und konzentrationsabhängige Stimulation der Spermien-Adenylatzyklase. Je 10 μ g Protein wurden ins Adenylatzyklase-Assay eingesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen Zink für 0, 20, 40, 60 und 90 min bei 32°C im Wasserbad stimuliert. Das produzierte cAMP wurde dann mit dem cAMP-ELISA bestimmt.

Die Aktivierung der Adenylatzyklase-Aktivität in humanen Spermien durch Zink war insofern überraschend, da Zink als Inhibitor der Adenylatzyklase-Aktivität somatischer Zellen beschrieben wurde (Tesmer et al., 1999). Darum sollte als nächstes untersucht werden, ob eine Aktivierung der Adenylatzyklase durch Zink auch in anderen Geweben wie Ratten-Lunge und anderen aus dem Hoden stammenden Zellen (z.B. Leydigzellen) meßbar ist. Für letztere Studien wurde die Tumor-Leydigzelllinie MA-10 eingesetzt, da diese Zellen in großen Mengen zur Verfügung standen. Abb. 13 zeigt, dass Zink die Adenylatzyklase-Aktivität in humanen Spermien in stärkerem Maße aktiviert als Magnesium. Diese Eigenschaft ist einzigartig, denn in MA-10 Zellen erfolgt zwar eine minimale Stimulation durch Zink, doch ist diese wesentlich geringer als die Stimulation durch Magnesium. In einem weiteren somatischen Gewebe, der Rattenlunge, erfolgte keine Stimulation durch Zink, sondern eher eine Inhibierung.

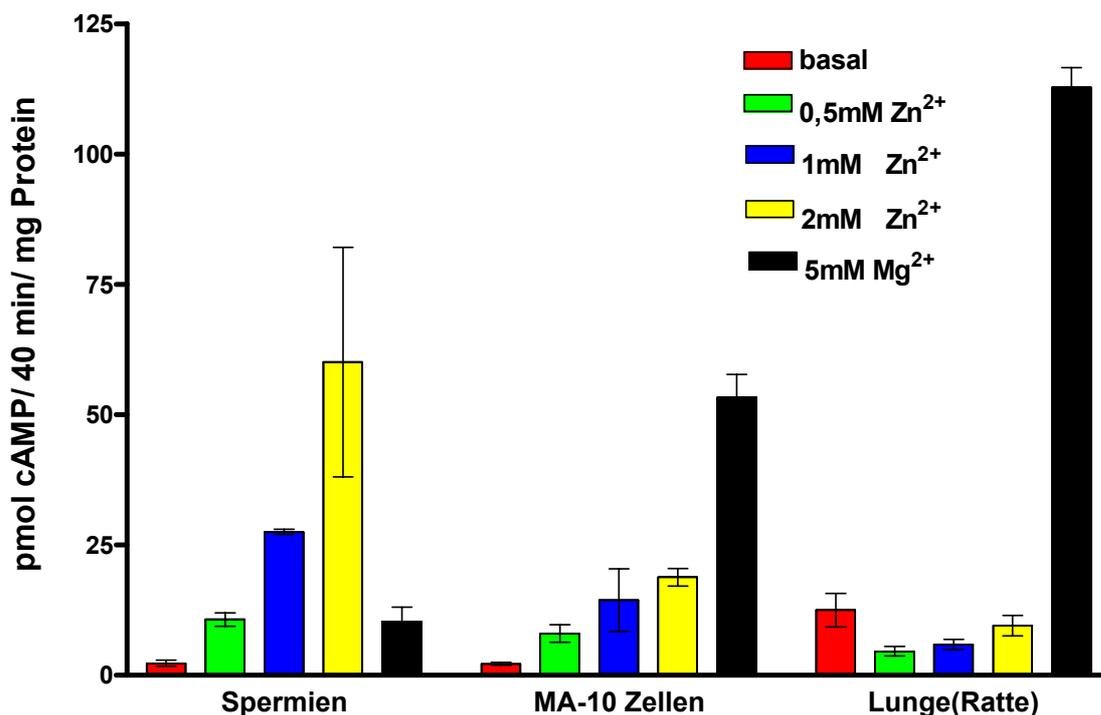


Abb. 13 Vergleich des Effektes von Zink auf die Adenylatzyklase-Aktivität in humanen Spermien, Maus-Tumor-Leydig (MA-10)-Zellen und Rattenlungen-Homogenat. Je 10 µg Protein aus den Homogenaten wurden in das Assay eingesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen Zink für 40 min bei 32°C im Wasserbad stimuliert. Das produzierte cAMP wurde dann per ELISA vermessen.

Es wurde in dieser Arbeit bereits gezeigt, dass die Adenylatzyklase-Aktivität in humanen Spermien nicht wesentlich geringer als die im Hoden ist. Von Interesse in diesem Zusammenhang waren die basalen cAMP-Spiegel in lebenden Spermien. Messungen der basalen cAMP-Spiegel in individuellen Proben zeigten eine hohe Variabilität im cAMP-Gehalt der Spermien unterschiedlicher Probanden (Abb. 14), als auch in den Spermienproben desselben Probanden an unterschiedlichen Spendentagen (grüne, blaue, rote Balken).

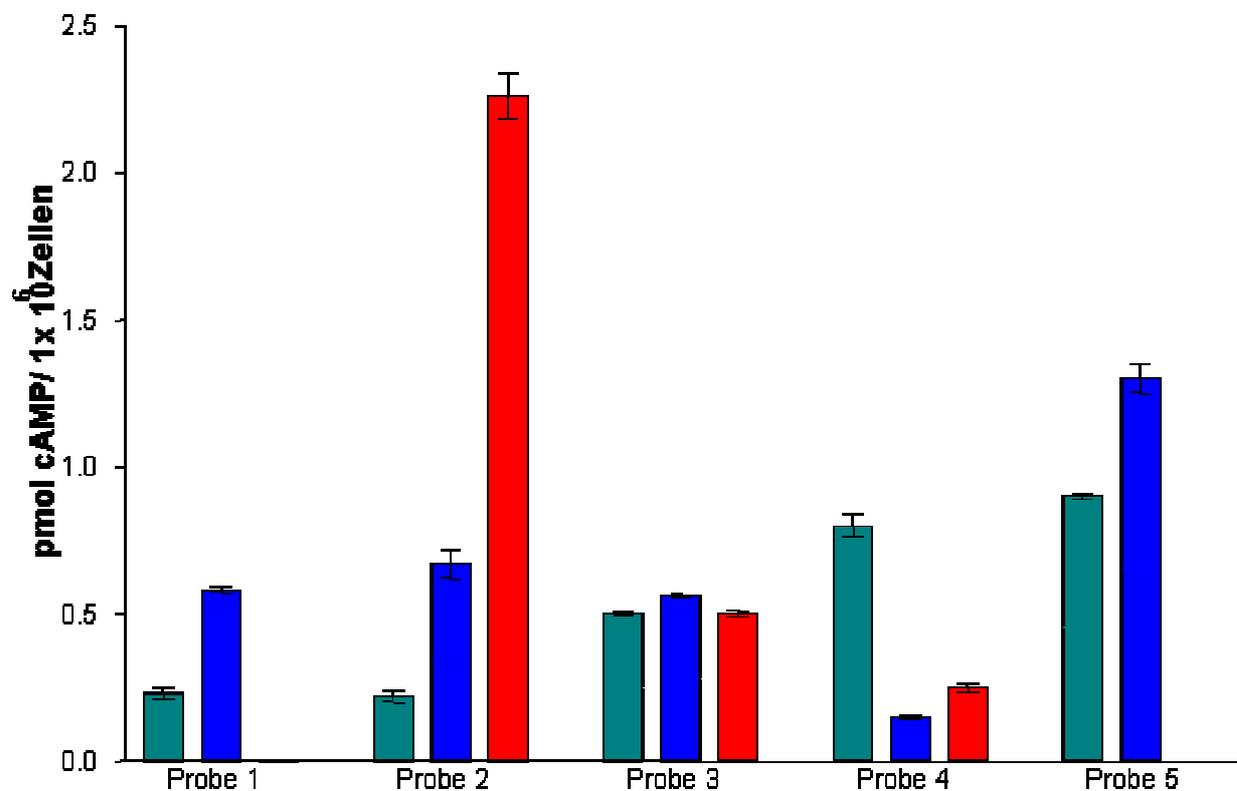


Abb. 14 Vergleich des cAMP-Gehalts einzelner Probanden untereinander und der selben Proben an verschiedenen Spendentagen (grüne, blaue und rote Balken stellen jeweils andere Spendentage dar). Je 10 Millionen gereinigte Swim-Up Spermien wurden mit 2 ml Ethanol versetzt, zentrifugiert und der Überstand im Evaporator abgedampft. Das Pellet wurde in Medium rückgelöst und der Gehalt an cAMP per cAMP-FIA bestimmt.

3.2 Untersuchungen zur Guanylatzyklase-Aktivität

Da in Seeigel-Spermien die Guanylatzyklase-Aktivität weitaus größer ist als in allen bekannten Geweben, von humanen Spermien aber keine Berichte zur Guanylatzyklase vorlagen, sollte untersucht werden, ob und welche Rolle die Guanylatzyklase in humanen Spermien spielt. Dazu wurde zunächst die Guanylatzyklase-Aktivität humaner Spermien mit der in humanem cerebralem Cortex und humanem Hoden verglichen.

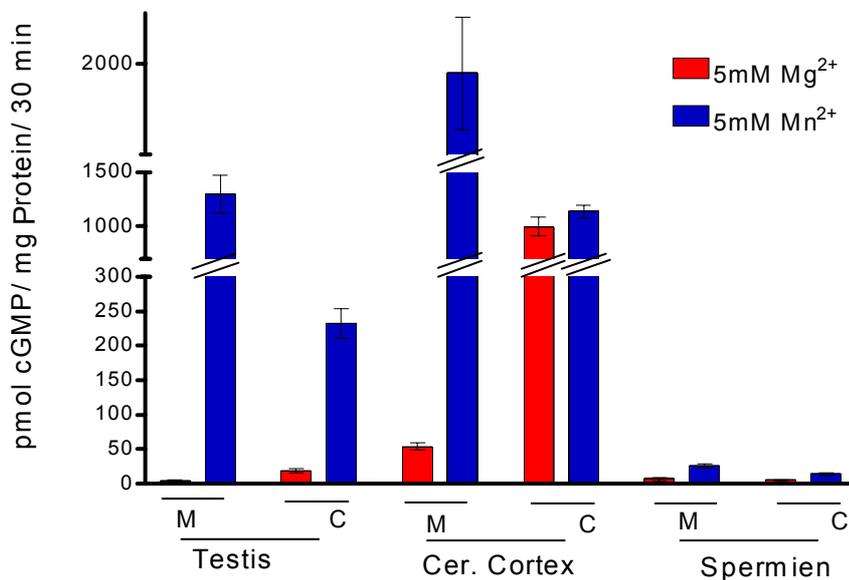


Abb. 15 Vergleich der Guanylatzyklase-Aktivität in Cytosol- und Membranfraktionen humaner Spermien, humanem cerebralem Cortex und Hoden. Je 10 µg Homogenat aus Membran (M)- oder Cytosolfraction (C) wurden für 30 min bei 32°C im Wasserbad im Guanylatzyklase-Assay mit 5mM Mg²⁺ oder Mn²⁺ stimuliert. Nach Proteinfällung wurde das produzierte cGMP im cGMP-ELISA bestimmt.

Die Untersuchungen ergaben eine nachweisbare Aktivität der Guanylatzyklase sowohl in der partikulären- als auch in der Cytosolfraction humaner Spermien, welche aber wesentlich geringer als in den beiden Vergleichsgeweben ist. Die

Aktivität der membranständigen Guanylatzyklase war in allen untersuchten Proben höher als die der löslichen Guanylatzyklase, und die Guanylatzyklase zeigte in allen 3 Proben eine höhere Aktivierbarkeit durch Mangan als durch Magnesium.

Da Ergebnisse zur Untersuchung der Adenylatzyklase-Aktivität eine Stimulation durch Zink zeigten, und auch die Guanylatzyklase von divalenten Kationen abhängig ist, wurde auch die Aktivierbarkeit der Guanylatzyklase durch Zink untersucht. Wie Abb. 16 zeigt, ist weder die lösliche Guanylatzyklase- noch die partikuläre Guanylatzyklase-Aktivität in humanen Spermien durch Zink aktivierbar.

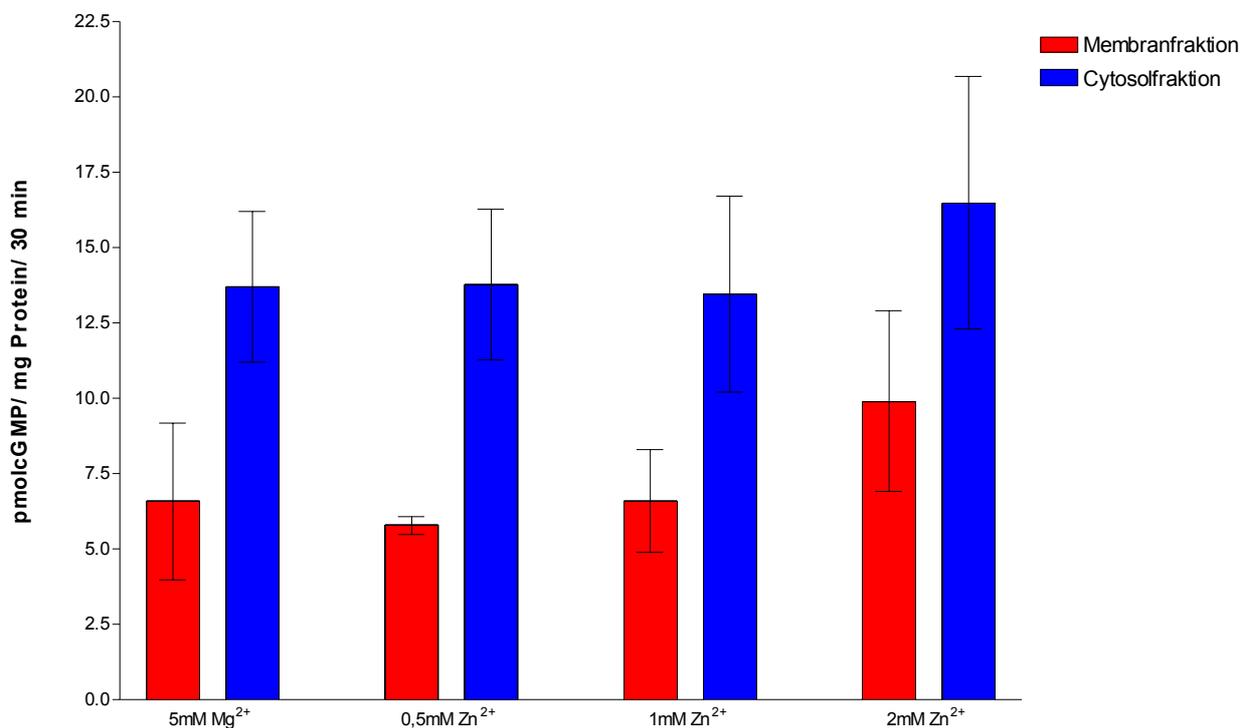


Abb. 16 Einfluss von Zink auf die Guanylatzyklase-Aktivität in Membran- und Cytosolfraction humaner Spermien. Humane Spermien wurden in Homogenisierungspuffer I im Mikro-Dismembrator homogenisiert und 40 min bei 100.000g zentrifugiert. Je 10 µg der Membran (rot) oder Cytosolfraction (blau) wurden in das Assay eingesetzt und 30 min bei 32°C mit verschiedenen Konzentrationen Zink sowie 5mM Mg²⁺ stimuliert. Das produzierte cGMP wurde per ELISA bestimmt.

Zur weiteren Charakterisierung der Guanylatzyklase-Aktivität in Spermien wurden Inkubationen mit bekannten Stimulatoren des Enzyms vorgenommen. Diese Untersuchungen wurden nicht mit Homogenaten, sondern mit lebenden Spermien durchgeführt. Abb. 18 zeigt, dass keines der natriuretischen Peptide einen Effekt auf die Aktivität der Guanylatzyklase in humanen Spermien hat. Im Gegensatz dazu konnte mit dem NO-Donor SNP eine verstärkte cGMP-Produktion induziert werden (Abb. 17). Diese Befunde deuten auf eine signifikante Expression der löslichen Guanylatzyklase in den Spermien hin, während die partikulären Guanylatzyklasen (Rezeptoren für natriuretische Peptide) offenbar gar nicht oder nur sehr schwach exprimiert werden.

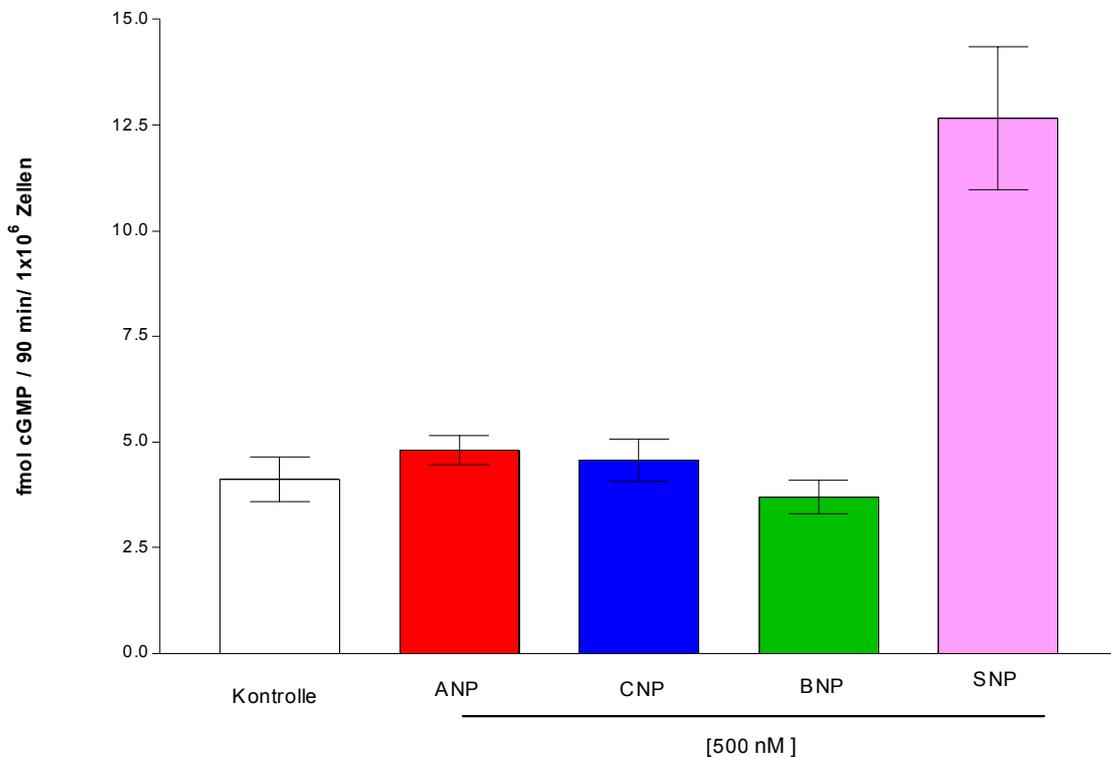


Abb. 17 Stimulierbarkeit der Spermien-Guanylatzyklase durch verschiedene natriuretische Peptide und SNP. Je 10 Millionen lebende Spermien wurden für 1.5 Stunden bei 36° im Wasserbad mit 500nm ANP, BNP, CNP oder SNP stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 2 ml Ethanol versetzt, zentrifugiert und im Evaporator abgedampft. Das Pellet wurde in MEM/HEPES rückgelöst und das produzierte cGMP im sensitiven cGMP-ELISA vermessen.

Untersuchungen der basalen cGMP-Spiegel in humanen Spermien (Abb. 18) zeigten eine extreme Variabilität zwischen den Messwerten einzelner Individuen und an verschiedenen Spendentagen (grüne, blaue, rote Balken).

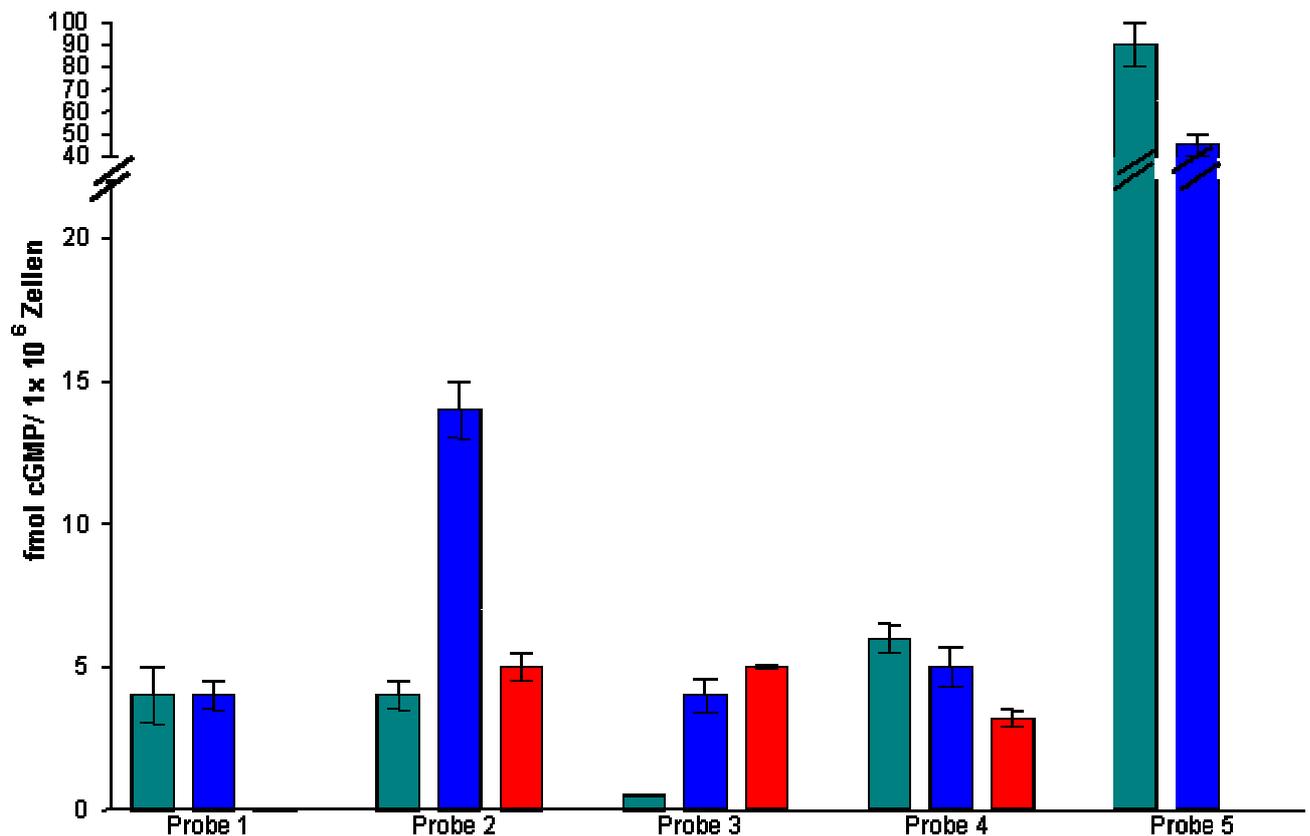


Abb. 18 Vergleich des cGMP-Gehalts einzelner Probanden untereinander und der selben Proben an verschiedenen Spendentagen (grüne, blaue und rote Balken stellen jeweils andere Spendentage dar). Je 10 Millionen gereinigte Swim-Up Spermien wurden mit 2 ml Ethanol versetzt, zentifugiert und der Überstand im Evaporator abgedampft. Das Pellet wurde in Medium rückgelöst und der Gehalt an cGMP per sensitivem cGMP- ELISA bestimmt.

Vergleichende Untersuchungen der basalen cAMP- und cGMP-Spiegel in Spermien der selben Probanden (Abb. 14 und Abb. 18), zeigten, dass die Konzentrationen an cAMP in humanen Spermien sehr viel größer als die cGMP-Konzentrationen sind.

3.3 Untersuchungen zur Tyrosinphosphorylierung der Proteine in humanen Spermien

3.3.1 Einfluss von cAMP und cGMP auf die Tyrosinphosphorylierung in humanen Spermien

Wie unter 1.5 beschrieben, spielen cAMP-medierte Signalwege eine herausragende Rolle bei der Initiation von Motilität, Kapazitation und Akrosomen-Reaktion der Spermien. In Spermien der Echinodermen wie dem Seeigel ist es aber cGMP, das die Hauptrolle bei der Initiierung dieser Prozesse übernimmt. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob cGMP auch eine wichtige Rolle bei der Tyrosinphosphorylierung humaner Spermien spielt. Um die Rolle der zyklischen Nukleotide bei der Tyrosinphosphorylierung genauer zu untersuchen, wurden humane Spermien mit 8-Br-cAMP bzw. 8-Br-cGMP inkubiert und anschließend Immunoblot-Analysen der phosphorylierten Proteine durchgeführt.

Abb. 29 zeigt eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung durch 0,5 und 1mM 8-Br-cAMP, während gleiche Konzentrationen cGMP keinen Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung in humanen Spermien zeigten.

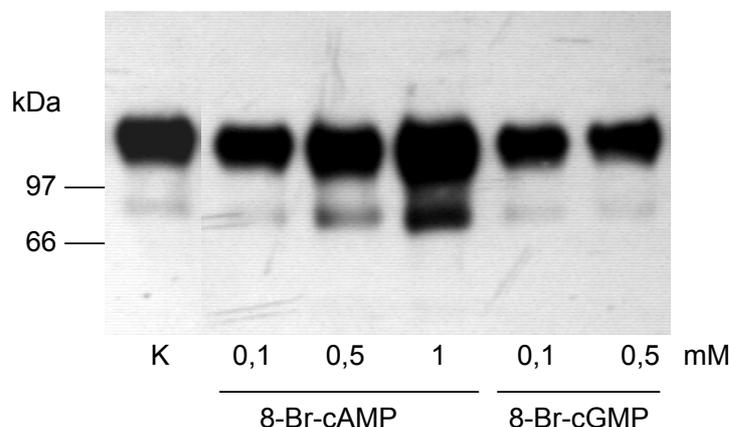


Abb. 19 Phosphotyrosin-Immunoblot humaner Swim-Up-Spermien. Je 5 Millionen Spermien wurden 1,5 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen 8-Br-cAMP oder 8-Br-cGMP bei 36° im Wasserbad inkubiert und mit 4x Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden daraufhin 5 Minuten bei 95°C erhitzt und auf ein 8% Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem monoklonalen Antikörper 4G10 in einer Konzentration von 1:1000 detektiert. Durch die anschließende Inkubation mit einem HRP-gekoppelten anti-mouse IgG Antikörper und anschließender ECL-Detektion wurden die Banden visualisiert.

Basierend auf Berichten, die einen Einfluss von Tyrosinphosphorylierung auf die Spermienmotilität zeigten, wurden als nächstes Untersuchungen zur Induzierung der Tyrosinphosphorylierung durch 8-Br-cAMP in motilen Swim-Up-Spermien und in immotilen Bottom-Spermien durchgeführt. Wie Abb. 20 zeigt, ist der basale Grad der Tyrosinphosphorylierung in immotilen („Bottom“-) Spermien wesentlich geringer als in den motilen („Swim-Up“-) Spermien, er kann aber durch 8-Br-cAMP erhöht werden (Spur 2).

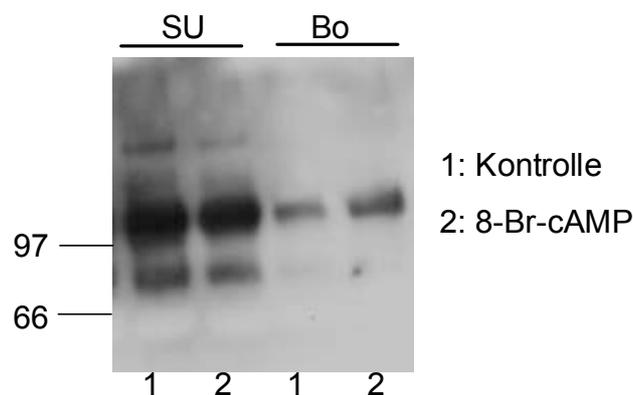


Abb. 20 Phosphotyrosin-Immunoblot von Swim-Up- (SU) und Bottom (Bo)-Spermien. Es wurden je 5 Millionen Spermien pro Ansatz eingesetzt. Spur 1 zeigt die unstimulierten Spermien, Spur 2 mit 1mM 8-Br-cAMP stimulierte Spermien. Die Stimulation erfolgte für 1.5 Stunden bei 36°C im Wasserbad. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde auf 8% Gelen durchgeführt, bevor der elektrophoretische Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem Phosphotyrosin-spezifischen monoklonalen Antikörper 4G10.

3.3.2 Einfluss von Zink auf die Tyrosinphosphorylierung in humanen Spermien

Wie unter 1.7 ausführlich beschrieben, sind die Diskussionen um den Einfluss von Zink auf die Spermienfunktionen kontrovers. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Zink die Adenylatzyklase aktivieren kann, sollte im Folgenden untersucht werden, ob Zink auch einen Einfluß auf die Tyrosinphosphorylierung ausüben kann. Um diese Frage zu klären, wurden humane Spermien mit Zink (Zink-Sulfat Heptahydrat) inkubiert und anschließend Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Abb. 21 zeigt, dass Zink in Swim-Up-Spermien die Tyrosinphosphorylierung zeit- und konzentrationsabhängig induziert.

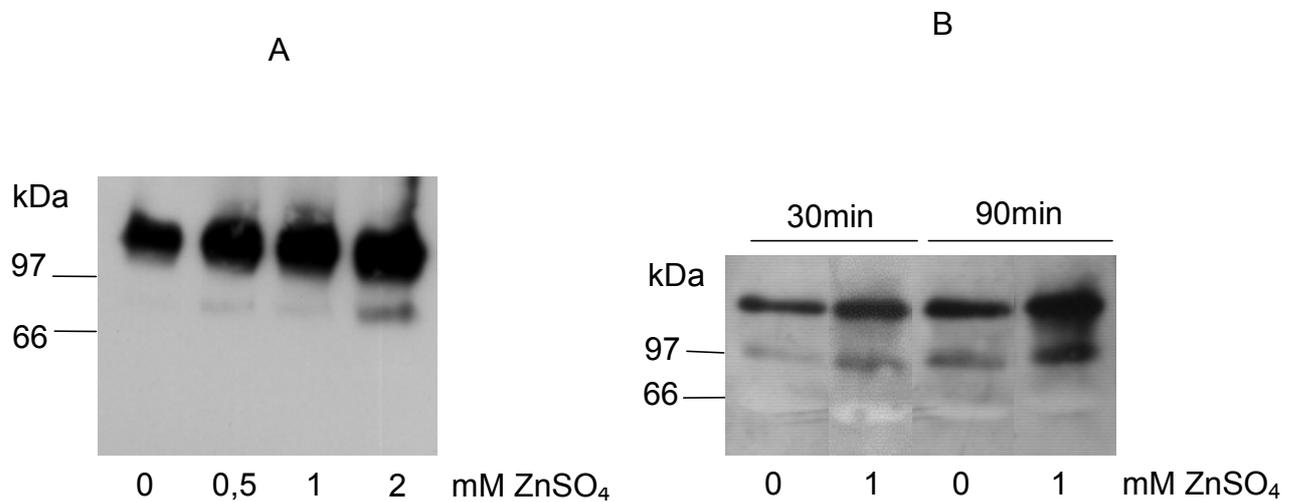


Abb. 21 Phosphotyrosin-Immunoblot Zink-stimulierter humaner Swim-Up Spermien. Je 5 Millionen Spermien wurden 1.5 Stunden bei 36°C im Wasserbad mit verschiedenen Konzentrationen ZnSO₄ (A) oder für verschieden lange Zeitdauer (B) stimuliert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 4G10 in einer Verdünnung von 1:1000.

Auch bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die immotilen Spermien weniger tyrosinphosphoryliert als die motilen Swim-Up-Spermien sind.

Wenn Zink in gleichen Konzentrationen wie cAMP in der Lage ist, zu einer Regulation der Spermienfunktionen beizutragen, so muß als nächstes untersucht werden, ob beide Substanzen die Tyrosinphosphorylierung in gleichem Maße induzieren können. Wie in Abb. 22 zu sehen ist, induziert Zink die Tyrosinphosphorylierung in humanen Swim-Up Spermien dreier Probanden in gleichem Ausmaß wie 8-Br-cAMP.

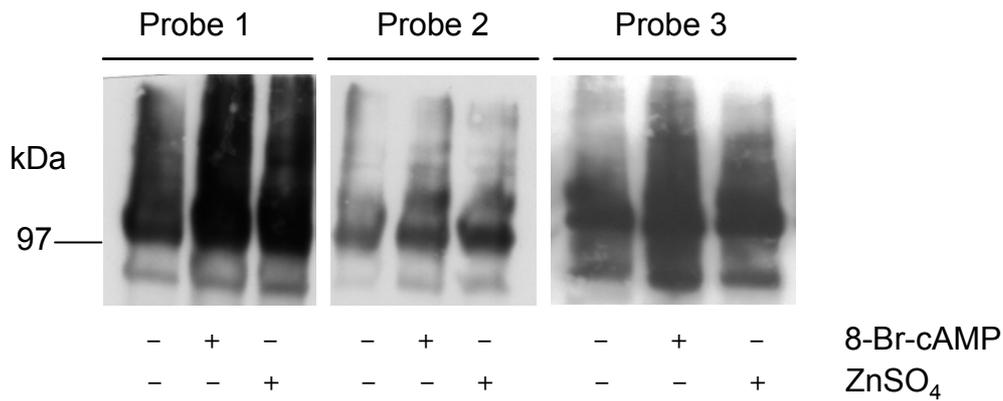


Abb. 22 Phosphotyrosin-Immunoblot von Spermien 3 verschiedener Probanden (Proben 1 bis 3). Die Abbildung zeigt, dass in allen Fällen die Tyrosinphosphorylierung sowohl in der Swim-Up Fraktion mit 1 mM 8-Br-cAMP als auch 1 mM Zink induziert wird. Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 4G10 in der Verdünnung 1:1000 bei 1-stündiger Inkubation nach elektrophoretischer Trennung und Blotten auf eine PVDF-Membran.

Da sowohl 8-Br-cAMP als auch Zink die Tyrosinphosphorylierung stark induzieren, stellte sich die Frage, ob diese Induzierung über einen PKA-vermittelten Signalweg verläuft. Versuche mit dem spezifischen PKA-Inhibitor H-89 zeigten, dass eine Inhibierung von PKA-Aktivität sowohl die 8-Br-cAMP- als auch die Zink-induzierte Tyrosinphosphorylierung verhindert (Abb. 23). Interessanterweise scheint auch die basale Tyrosinphosphorylierung bereits durch H-89 gehemmt zu werden.

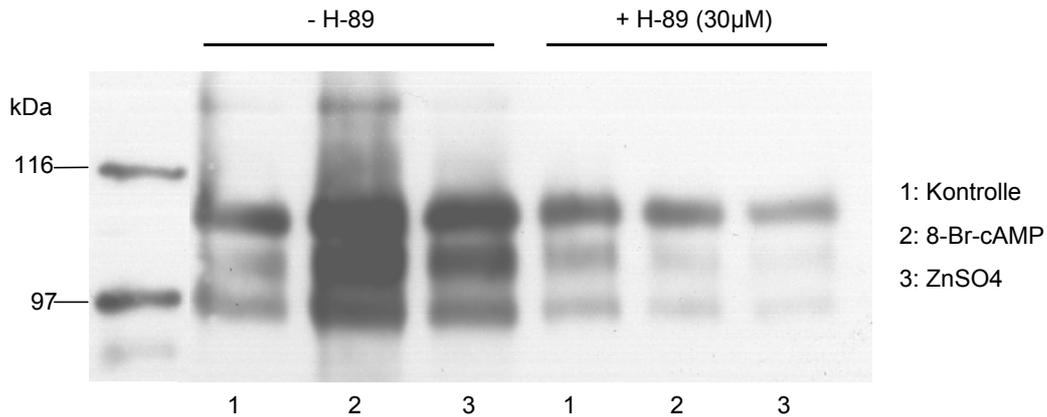


Abb.23 Einfluss des PKA-Inhibitors H-89 auf 8-Br-cAMP und Zink-stimulierte Tyrosinphosphorylierung humaner Swim-Up-Spermien. Spermien wurden für 1.5 Stunden mit 1 mM 8-Br-cAMP oder 1 mM ZnSO₄ bei 36°C im Wasserbad in Anwesenheit (rechte Bildhälfte) oder Abwesenheit (linke Bildhälfte) von 30 M H-89 inkubiert und die Reaktionsprodukte durch einen Phosphotyrosin-Immunoblot analysiert. Die Anwesenheit von H-89 hemmt sowohl die durch beide Agenzien induzierte Tyrosinphosphorylierung als auch die basale Tyrosinphosphorylierung in humanen Swim-Up-Spermien.

3.4 Untersuchungen zur GSK-3

3.4.1 Untersuchungen zur Expressierung von GSK-3 in humanen Spermien

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass in humanen Spermien beide Isoformen der GSK-3 (GSK-3 α , 51 kDa und GSK-3 β , 46 kDa) vorkommen (Abb. 24, Spur 1 und Spur 2). Kontrollanalysen wurden mit Homogenaten aus humanem cerebralem Cortex oder Nebenhoden eingesetzt (Spur 3 und Spur 4).

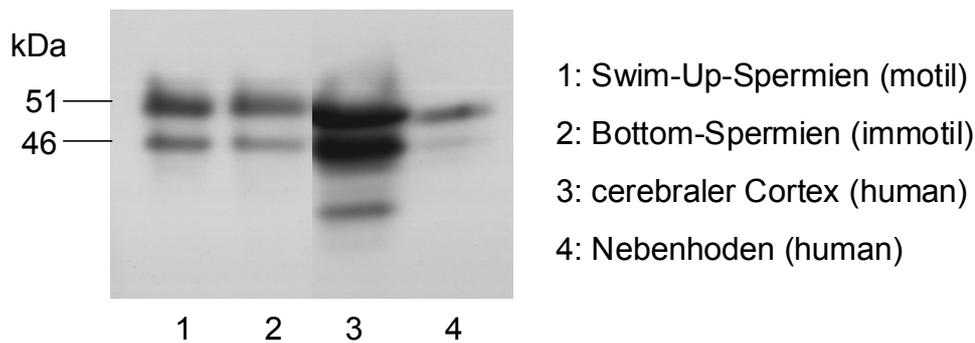


Abb. 24 GSK-3-Immunoblot. Spermien eines Probanden wurden einer Swim-Up-Prozedur unterzogen. Je 5 Millionen Swim-Up- (motil) und Bottom- (immotil) Spermien sowie Gesamthomogenat (je 50 μg Protein) aus humanen cerebralem Cortex oder Nebenhoden wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen GSK-3 α/β , welcher das Protein phosphorylierungsunabhängig erkennt.

Weiterhin zeigt die Abb. 25, dass motile und immotile Spermien einen gleichen Gehalt des Enzyms GSK-3 aufweisen.

Basierend auf Befunden (Vijayaraghavan et al., 2000), dass GSK-3 in bovinen Spermien eine Rolle bei der Regulation von Motilität spielen könnte, wurde untersucht, ob cAMP einen Einfluss auf den Aktivitätsstatus der Kinase in humanen Spermien haben könnte.

3.4.2 Untersuchungen zum Einfluß von cAMP und Zink auf die Aktivität der GSK-3

Untersuchungen mit einem Antikörper gegen an Serin-9 phosphorylierter GSK-3 β konnten eine zeit- und konzentrationsabhängige Serin-Phosphorylierung und damit Inaktivierung der GSK-3 β durch cAMP zeigen (Abb. 25).

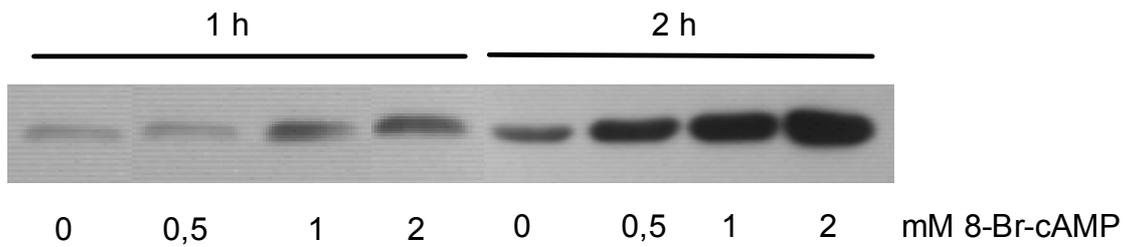


Abb. 25 GSK-3 β Ser-9 Immunoblot humaner Bottom-Spermien. Je 5 Millionen Spermien wurden für 1 Stunde oder 2 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen 8-Br-cAMP stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und mit einem GSK-3 β Ser-9 spezifischen Antikörper detektiert.

Analoge Versuche zur Inaktivierung der GSK-3 β in humanen Spermien durch Stimulation mit cGMP zeigten keinen Effekt (Abb. 27).

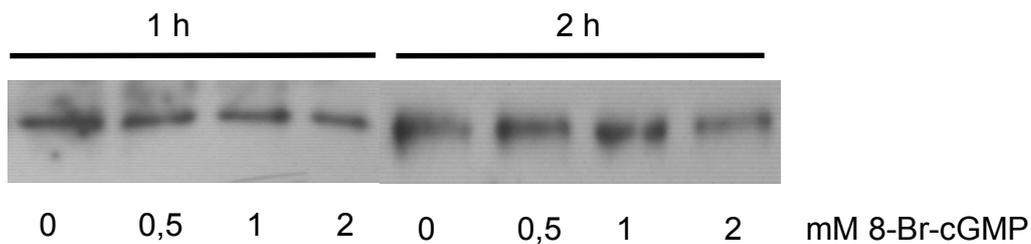


Abb. 26 GSK-3 β Ser-9 Immunoblot humaner Bottom-Spermien. Je 5 Millionen Spermien wurden für 1 Stunde oder 2 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen 8-Br-cGMP stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und mit einem GSK-3 β Ser-9 spezifischen Antikörper detektiert.

Da sich in dieser Arbeit vermehrt Hinweise ergeben haben, dass auch Zink eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion humaner Spermien spielen kann, wurde auch der Einfluß von Zink auf die Aktivität der GSK-3 in Spermien untersucht. Wie Abb. 27 zeigt, ist Zink ebenfalls in der Lage, die GSK-3 zeit- und konzentrationsabhängig zu inaktivieren.

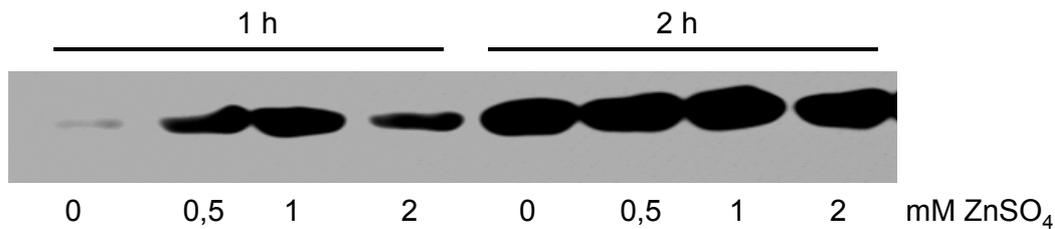


Abb. 27 GSK-3 β Ser 9 Immunoblot humaner Bottom-Spermien. Je 5 Millionen Spermien wurden für 1 Stunde oder 2 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Zink stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und mit einem GSK-3 β Ser-9 spezifischen Antikörper in einer Verdünnung 1:1000 detektiert.

Da cAMP und Zink, welche mit der Motilität in Spermien in Verbindung gebracht werden, in der Lage sind, beide Isoformen der GSK-3 zu inhibieren, besteht die Möglichkeit, dass motile und immotile, aber vitalen Spermien (von der Gemeinschaftspraxis charakterisiert) einen Unterschied in der Regulation der GSK-3 aufweisen. Immuno-Blots mit solchen Spermien zeigten, dass GSK-3 Ser-21 (GSK-3 α) und GSK-3 Ser-9 (GK-3 β) in motilen und immotilen Spermien unterschiedlich exprimiert sind (Abb. 28). GSK-3 α ist wesentlich stärker in motilen als in immotilen Spermien exprimiert. Außerdem zeigt die Abbildung, dass Stimulation der Spermien mit 1mm 8-Br-cAMP zu einer Serin-Phosphorylierung und somit zu einer Inaktivierung beider Isoformen führt.

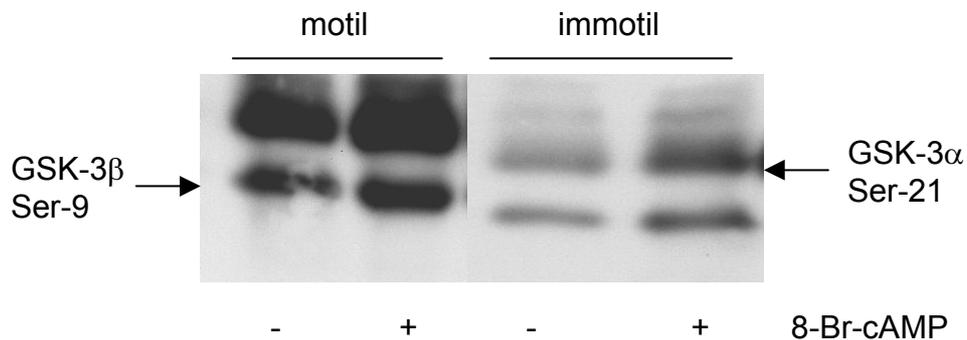


Abb. 28 GSK-3-Ser-Immunoblot motiler und immotiler, aber vitaler Spermien. Je 5 Millionen Spermien wurden mit 1 mM 8-Br-cAMP für 1.5 Stunden bei 36°C im Wasserbad stimuliert, anschließend per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper, der spezifisch die Serin-phosphorylierte Form beider GSK-3-Isoformen erkennt, in einer Verdünnung von 1:1000.

Da auch in diesen Versuchen cAMP und Zink gleiche Effekte ausüben, wurde wieder eine Involvierung der PKA überprüft, indem der PKA-Inhibitor H-89 eingesetzt wurde. Abb. 29 zeigt zum Einen, dass auch die GSK-3 α durch cAMP und Zink inaktiviert wird, zum Anderen auch, dass sich nur die durch cAMP induzierte Serin-Phosphorylierung der GSK-3 inhibieren läßt, nicht jedoch die durch Zink induzierte.

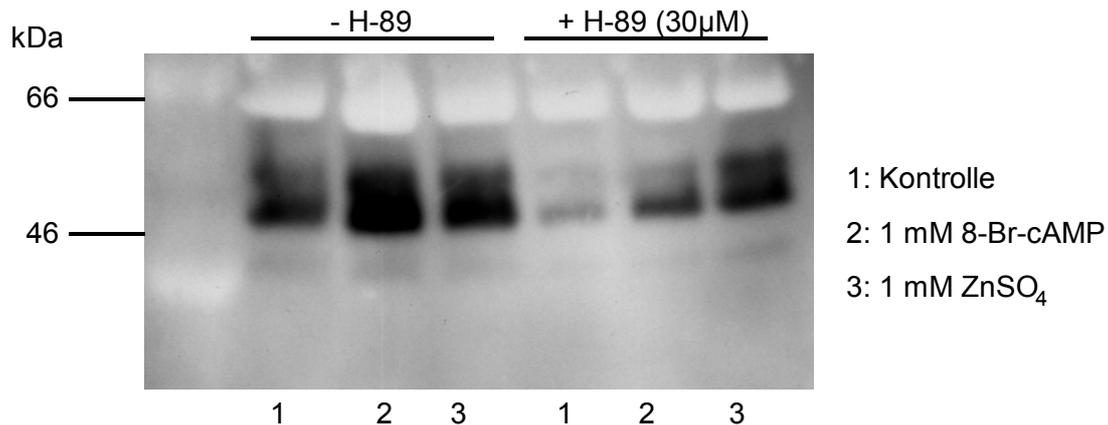


Abb. 29 GSK-3 α/β -Ser-Immunoblot 8-Br-cAMP- und Zink-stmulierter humaner Spermien in Anwesenheit (rechte Bildhälfte) und Abwesenheit (linke Bildhälfte) des PKA-Inhibitors H-89. Je 5 Millionen Spermien wurden 1.5 Stunden bei 36°C im Wasserbad mit cAMP oder Zink stimuliert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet, bevor sie mit einem Antikörper gegen GSK-3 in Serin-phosphorylierter Form in einer Verdünnung von 1:1000 detektiert wurden.

3.4.3 Untersuchungen zu Regulatoren der GSK-3

Die Untersuchungen zeigten, dass die GSK-3 in beiden Isoformen in humanen Spermien exprimiert ist, durch Regulatoren der Spermienfunktionen wie cAMP und Zink inhibierbar und zudem mit der Motilität humaner Spermien assoziiert ist. Es konnte weiter gezeigt werden, dass der Einfluss von cAMP über den PKA-Signalweg läuft, nicht jedoch der Einfluß von Zink. So lag es nahe, Untersuchungen zu weiteren Regulatoren der GSK-3 Aktivität durchzuführen.

Ein gut beschriebener Signalweg, der über die GSK-3 führt, ist die Vermittlung der Wirkung von Insulin. Hier wird die Phosphoinositid-3-OH-Kinase (PI3-Kinase) eingeschaltet, welche zu einer Inhibierung der GSK-3 über die Proteinkinase B (PKB/Akt) führt (Cross et al., 1995).

Western-Blot Analysen mit einem Antikörper gegen die 85 kDa-Untereinheit der PI3 Kinase zeigten nicht nur, dass die PI3-Kinase in humanen Spermien exprimiert ist, sondern auch eine unterschiedliche Expressierung in motilen und immotilen Spermien. Abb. 30 zeigt, dass die 85 kDa-Untereinheit der PI3-Kinase mehr in motilen (Swim-Up, SU) -Spermien eines Probanden exprimiert ist, als in den immotilen (Bottom, Bo)-Spermien, aber weder cAMP noch Zink einen Einfluss aufweisen.

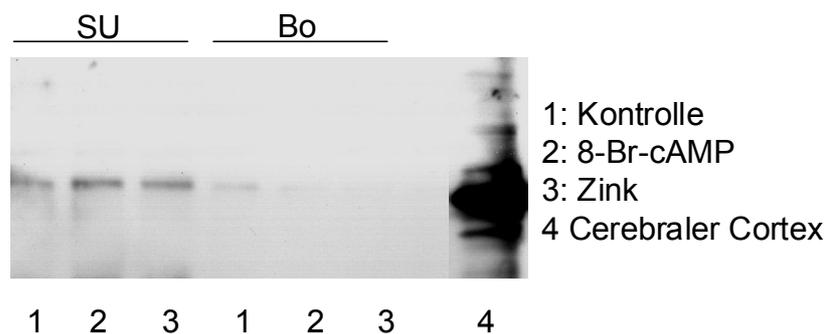


Abb. 30 PI3-Kinase-Western-Blot humaner Spermien. Nach der Swim-Up Prozedur wurden je 5 Millionen Swim-Up (SU, motil) und Bottom (Bo, immotil)- Spermien eines Probanden mit 1 mM 8-Br-cAMP oder Zink stimuliert, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen die 85kDa Untereinheit der PI3-Kinase.

Da die Untersuchungen die Expression der PI3-Kinase in humanen Spermien zeigten, wurden als nächstes Untersuchungen zur PKB/Akt in humanen Spermien durchgeführt. Immunoblot-Analysen mit einem Antikörper, der alle 3 Isoformen der PKB (PKB α , β , γ , bzw. Akt 1,2,3) unabhängig ihres Phosphorylierungsstatus erkennt, zeigten, dass PKB im Hoden von Maus und Mensch stark exprimiert ist (Abb. 31, 1 und 6). Die PKB ist dabei sowohl in primären Maus-Leydigzellen als auch in der Tumor-Leydigzelllinie MA-10 detektierbar (Spur 2 und 3). Im menschlichen Hoden ist die PKB sowohl in der Membran (M)- als auch in der Cytosolfraktion (C) detektierbar (7). Auch in der Cytosolfraktion (C) von Fett der Epididymis und in der Cytosolfraktion des Peritonealfetts der Ratte ließ sich die Bande detektieren (5 und 6). In den Membranfraktionen war jedoch keine Bande detektierbar.

Wie die Abbildung aber deutlich zeigt, war weder in der Membran- noch in der Cytosolfraktion humaner Spermien das PKB/Akt-Protein nachweisbar.

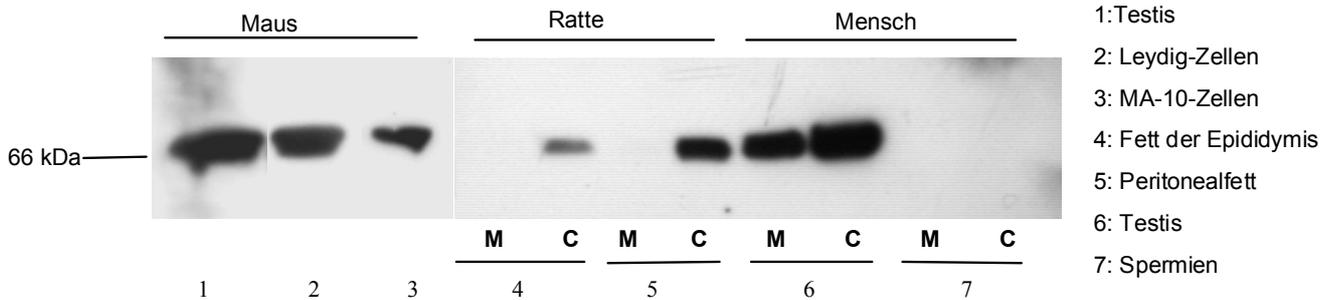


Abb. 31 PKB/Akt-Immunoblot verschiedener Gewebe und Zellen von Maus, Ratte und Mensch. Gewebe wurden in Stickstoff schockgefroren, mit einem Hammer zerkleinert und im Mörser kleingerieben, bevor sie mit Homogenisierungspuffer II versetzt wurden. Spermien wurden im Mikrodismembrator homogenisiert, Maus-Leydigzellen und MA-10 Zellen zentrifugiert, in PBS gewaschen und mit je 20 Schüben in Homogenisierungspuffer II im Douncer zerkleinert. Zur Herstellung von Membran- und Cytosolfractionen wurden die Homogenate 40 min bei 100.000g zentrifugiert. Je 50µg Protein wurden elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend mit einem PKB-Antikörper detektiert.

Da PKB/Akt nicht in humanen Spermien nachweisbar war, wurde eine weitere Kinase in humanen Spermien untersucht, die einen Einfluß auf den Phosphorylierungsstatus der GSK-3 haben kann, die Integrin-Linked Kinase (ILK, bzw. p59^{ILK}, Troussard et al., 1999).

Abb. 32 zeigt das Vorkommen der ILK in humanen Spermien.

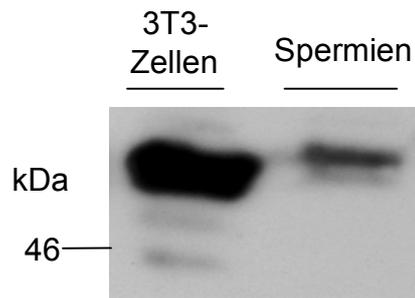


Abb. 32 ILK-Immunoblot humane Spermien. Je 5 Millionen Spermien wurden für 1,5 h mit 1 mM 8-Br-cAMP oder Zink stimuliert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung, Blotten auf eine PVDF-Membran und Detektion mit einem ILK-spezifischen Antikörper.

Ein weiteres Enzym, welches eine wichtige Rolle bei der Regulation der GSK-3-Aktivität spielen kann, ist die Proteinphosphatase 2A (PP2A, Seeling et al., 1999; Ikeda et al., 2000). Für die Untersuchungen in humanen Spermien wurden Antikörper gegen unterschiedliche regulatorische Untereinheiten des Enzyms (A, B α) eingesetzt. Abb. 33 zeigt, dass in motilen Spermien die PP2A/B α Untereinheit hoch exprimiert wird, während in immotilen Spermien die PP2A/A alleinig und in weitaus größeren Mengen zu detektieren ist.

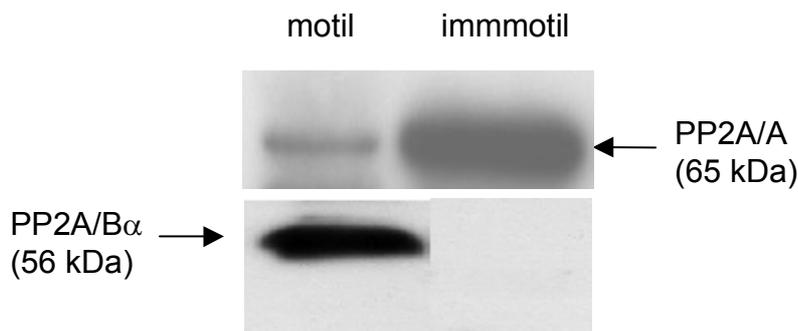


Abb. 33 Western Blot humaner Spermien mit Antikörpern gegen verschiedene Untereinheiten der PP2A. Je 5 Millionen motile und immotile, aber vitale Spermien (von der Gemeinschaftspraxis charakterisiert) wurden 1.5 Stunden im Wasserbad bei 36°C inkubiert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Inkubation erfolgte mit einem Antikörper gegen die regulatorischen Untereinheiten PP2A/A (65 kDa) und PP2A/B α (56 kDa).

3.4.4 Untersuchungen zu Zellproteinen der GSK-3

Da die PP2A Einfluss auf die GSK-3 Aktivität nehmen kann (Ikeda et al., 2000), wurde ein Zielprotein der GSK-3 untersucht, welches mit beiden Enzymen in Verbindung gebracht wird, nämlich ist β -Catenin. Abb. 34 zeigt, dass im Western-Blot mit dem β -Catenin-Antikörper kein Signal in Gesamthomogenat, Membran- und Cytosolfraktion humaner Spermien zu detektieren ist. Als Postivkontrolle wurden Membranfraktionen aus humanem, cerebralem Cortex untersucht.

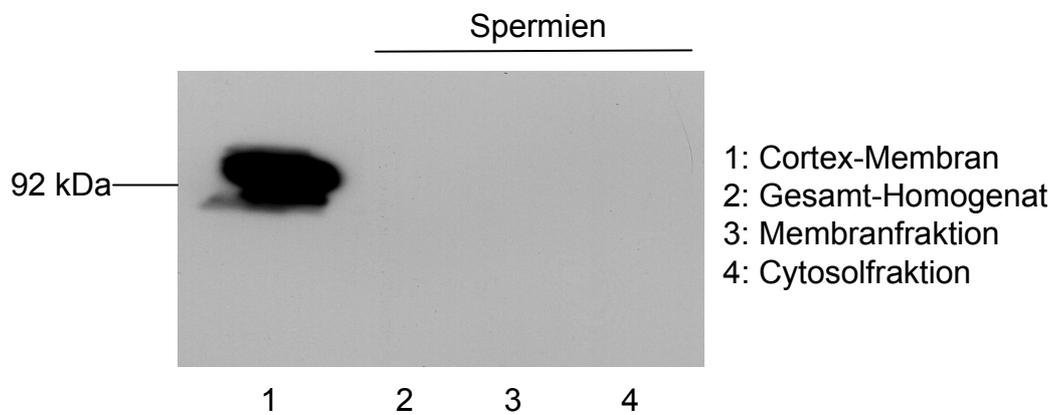


Abb. 34 β -Catenin Western-Blot humaner Spermien. Je 50 μ g Protein wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem Antikörper gegen β -Catenin detektiert.

3.5 Proteomics

3.5.1 Unterschiede der Proteinexpression in Swim-Up und Bottom-Fraktion

Die Auftrennung mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese von Proteinextrakten von Swim-Up und Bottom Spermien eines Patienten (pH-Bereich 3-10) zeigte einige Unterschiede zwischen motilen und immotilen Spermien (Abb. 35). In der Abbildung sind 3 markante Bereiche farbig markiert, die zur besseren Verdeutlichung der Unterschiede vergrößert in Abbildung 36A, B und C dargestellt sind.

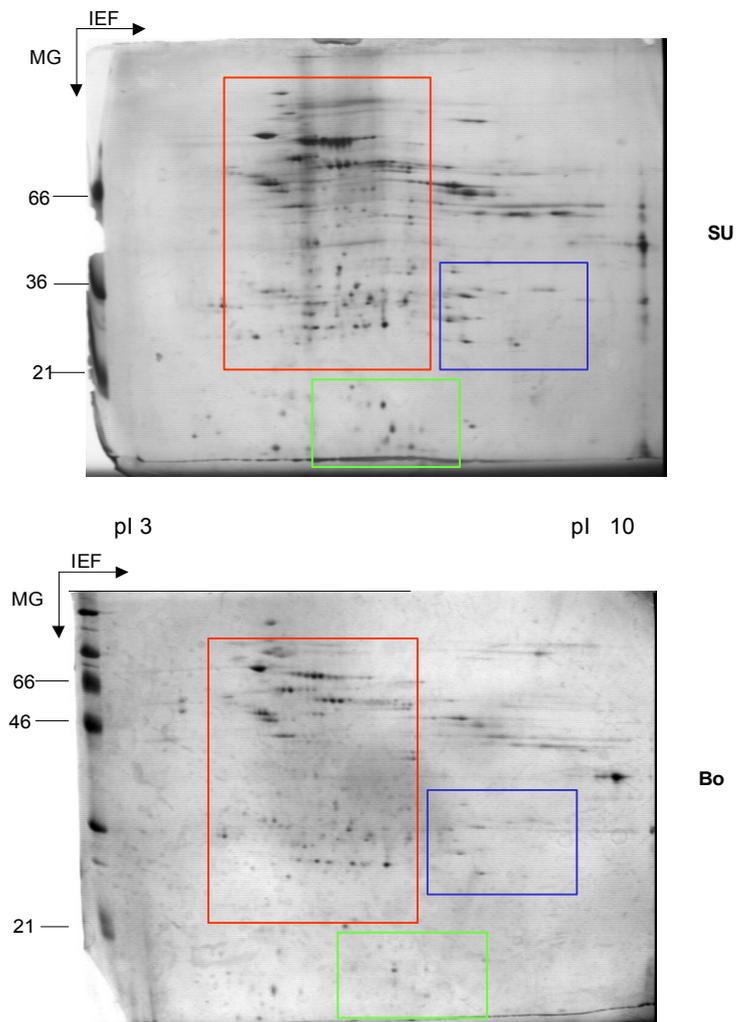
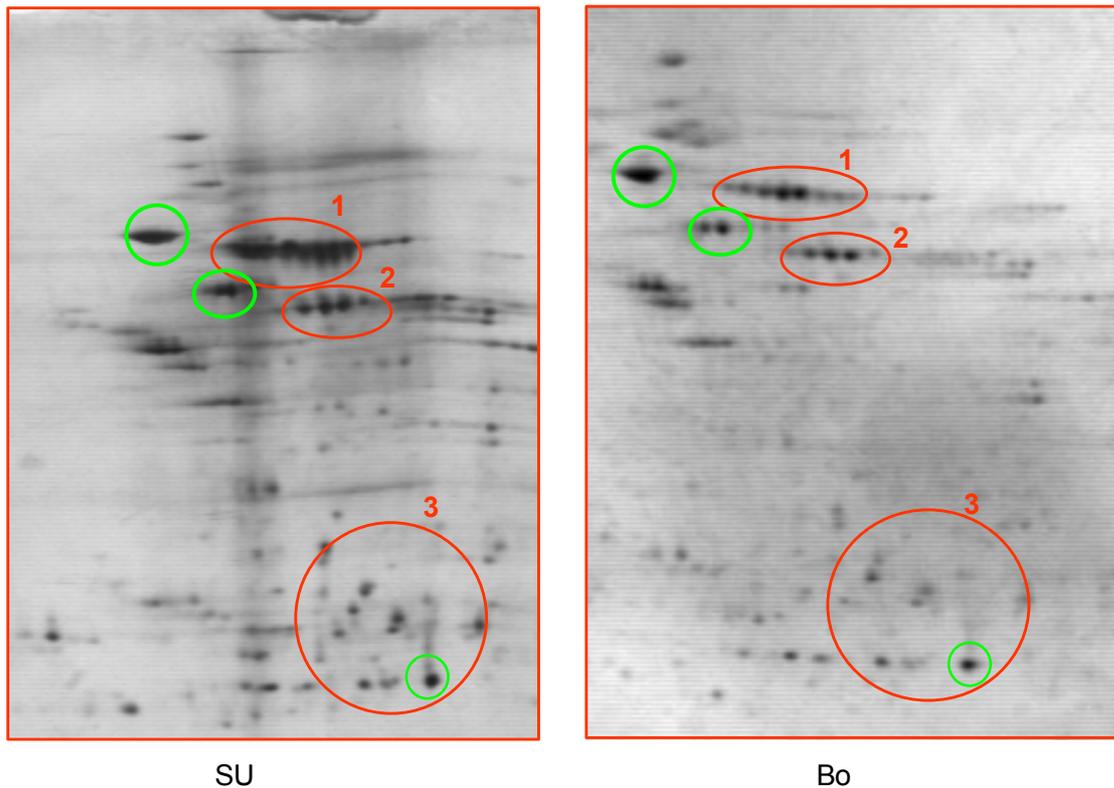


Abb. 35 2-dimensionale Gelelektrophorese humaner Swim-Up- und Bottom-Spermien eines Probanden. Je 200µg Proteinhomogenat wurden auf einen IPG-Strip pH 3-10 aufgetragen und einer isoelektrischen Fokussierung unterzogen, bevor sie auf einem 12.5% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Danach wurden die Gele mit dem Amersham Silver-PlusOne-Kit gefärbt und digitalisiert. Es sind 3 markante Bereiche, in denen sich Unterschiede in der Expression von Proteinen bei gleich viel aufgetragenem Protein zeigen, farbig markiert (rot, grün und blau). Diese Bereiche sind in den Abbildungen 36 A, B und C vergrößert dargestellt.



A

Abb. 36A Vergrößerte Darstellung eines Teilbereiches (rotes Feld) aus Abb. 35. Der Molekulargewichtsbereich umfaßt ca. 21- 70 kDa, der pH-Bereich ca. 4-7. Es sind 3 markante Bereiche rot markiert, in denen sich eine deutliche Verringerung der Identität der Spots in den Bottom-Spermien aufzeigen läßt. In den Bereichen 1 und 2 sind 2 Spot-Ketten zu erkennen, die auf eine posttranslationale Modifikation eines Proteins schließen lassen. Beide Bereiche zeigen eine deutlich geringere Intensität in den Bottom-Spermien. Auch im Bereich 3 sind in den Swim-Up Spermien deutlich stärkere Spots erkennbar, und einige scheinen in den Bottom-Spermien sogar ganz zu fehlen. Dass die Verringerung der Spot-Intensität in den Bottom-Spermien aber nicht auf generell kleinere aufgetragene Proteinmengen zurückzuführen ist, zeigen die grün markierten Bereiche, in denen die Intensität der gleichen Spots in Swim-Up und Bottom-Spermien vergleichbar ist.

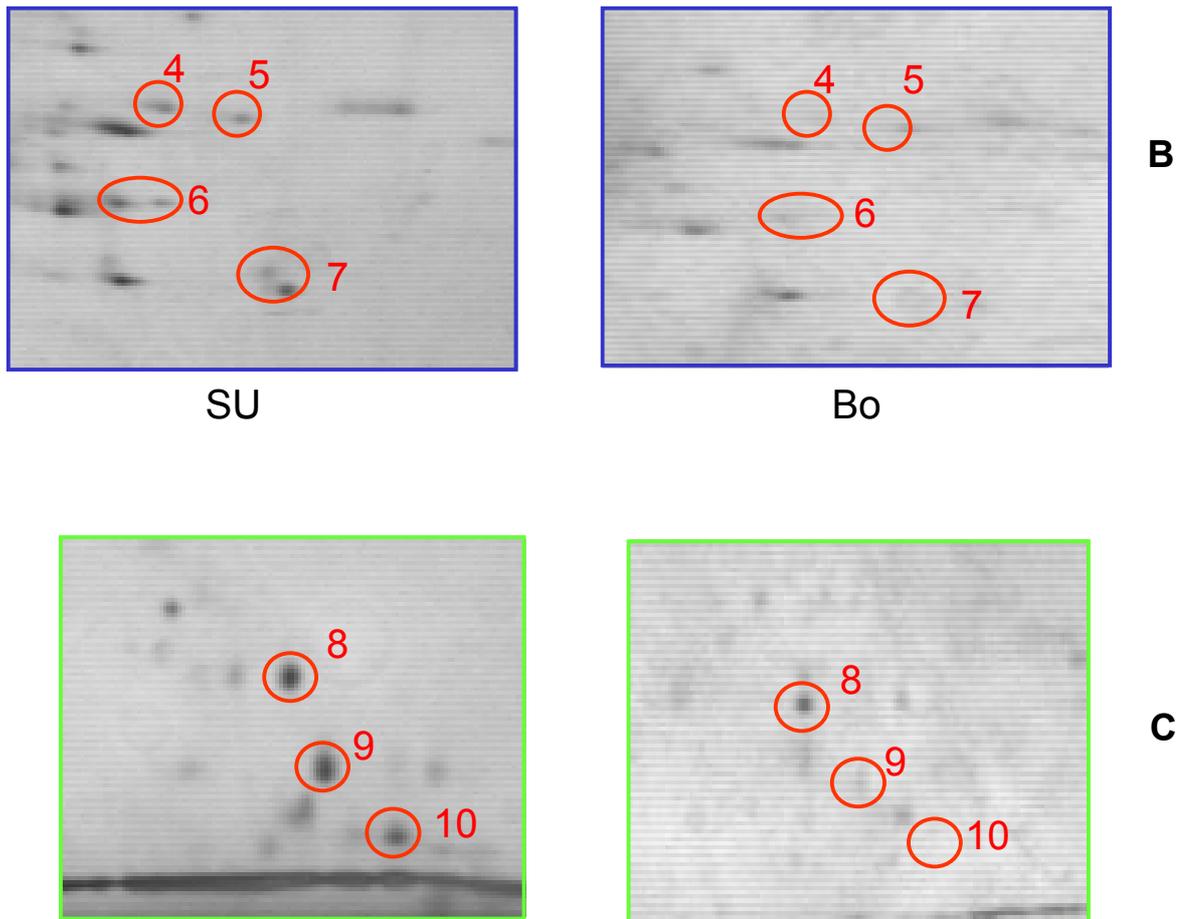


Abb. 36B und C Vergrößerte Darstellung eines Teilbereiches (blaues Feld (B) und grünes Feld (C)) aus Abb. 36. Der Molekulargewichtsbereich umfaßt ca. 21-40 kDa und einen pH >6 (B) sowie ca. 10-21 kDa (C). In B sind 4 markante Bereiche rot markiert (5-8), in denen sich eine deutliche Verringerung der Intensität der Spots in den Bottom-Spermien aufzeigen läßt. In C sind 3 Einzelspots gezeigt, deren Intensität in den Bottom-Spermien abnimmt (8,9) oder die ganz fehlen (10). Dass die Verringerung der Spot-Intensität in den Bottom-Spermien aber nicht auf generell kleinere aufgetragene Proteinmengen zurückzuführen ist, zeigen die grün markierten Bereiche, in denen die Intensität der gleichen Spots in Swim-Up und Bottom-Spermien vergleichbar ist.

3.5.2 Unterschiede in der Proteinexpression zwischen cytosolischer und partikulärer Fraktion humaner Spermien

Als nächstes wurden die partikulären- und cytosolische Proteinfractionen humaner Swim-Up-Spermien separat untersucht. Abb. 37 zeigt die erwarteten Unterschiede im Proteinmuster der Fraktionen.

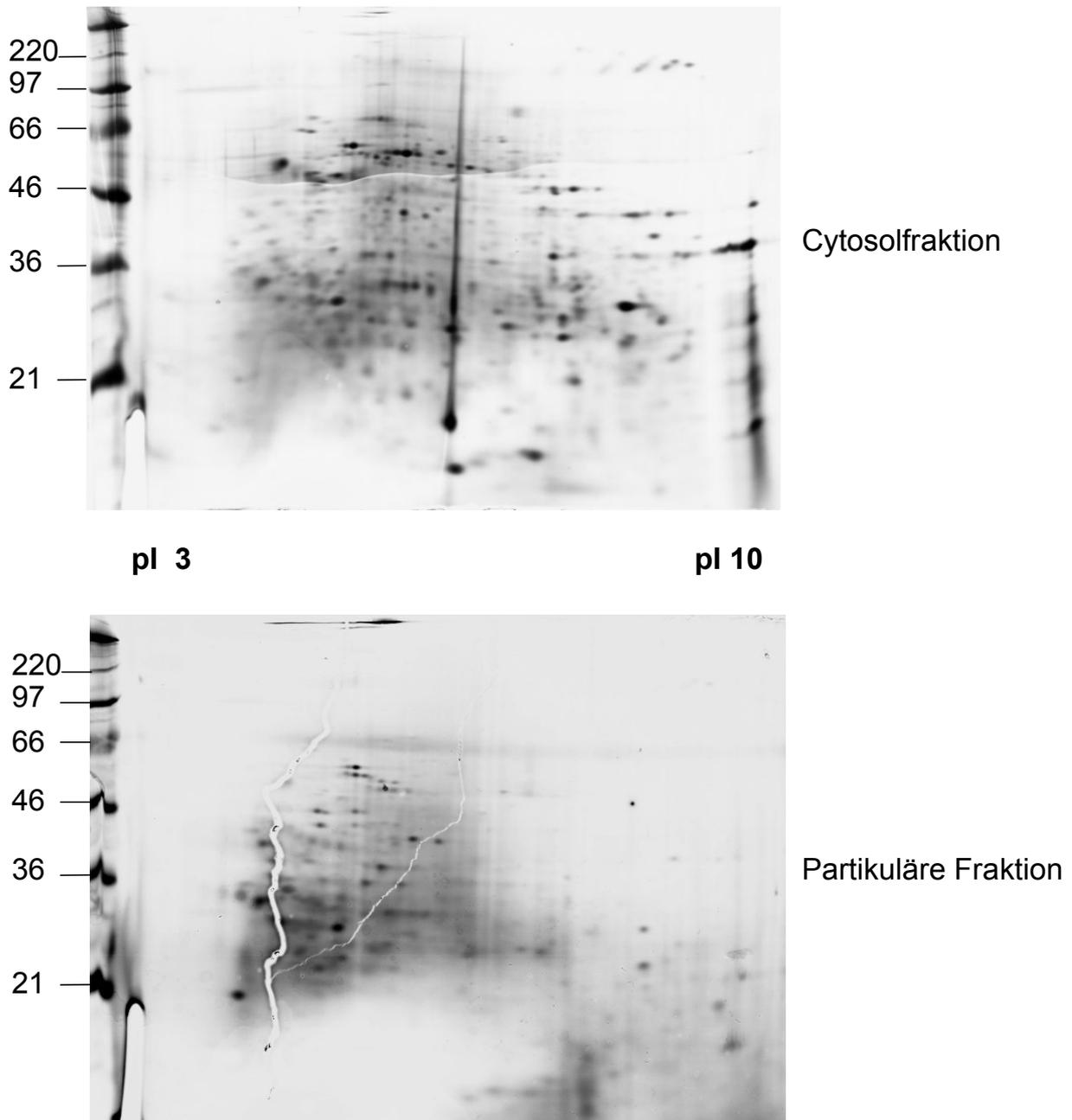


Abb. 37 2D-Elektrophorese der Cytosol- (A) und partikulären Fraktion (B) der Spermien eines Probanden (Swim-Up-Spermien). Je 100 µg Protein wurden auf einen 13 cm Strip des pH-Bereiches 3-10 fokussiert und anschließend einer elektrophoretischen Trennung auf 12.5% SDS-Gele unterzogen. Danach wurden die Gele fixiert und mit der Methode der alkalischen Silberfärbung gefärbt.

3.5.3 Unterschiedliche Darstellung des Spermien-Proteoms durch verschiedenen pH-Gradienten

Die Benutzung eines weiten pH-Gradienten (pH 3-10) ist sinnvoll, um einen Überblick über das Proteom zu erhalten. Für eine bessere Auflösung von wurden sodann 24cm-Strips mit pH Gradienten von 4-7 und 6-9 benutzt. Abb. 38 zeigt den Unterschied in der Auflösung in den Swim-Up und Bottom-Spermien eines Probanden bei der Nutzung der unterschiedlichen Gradienten.

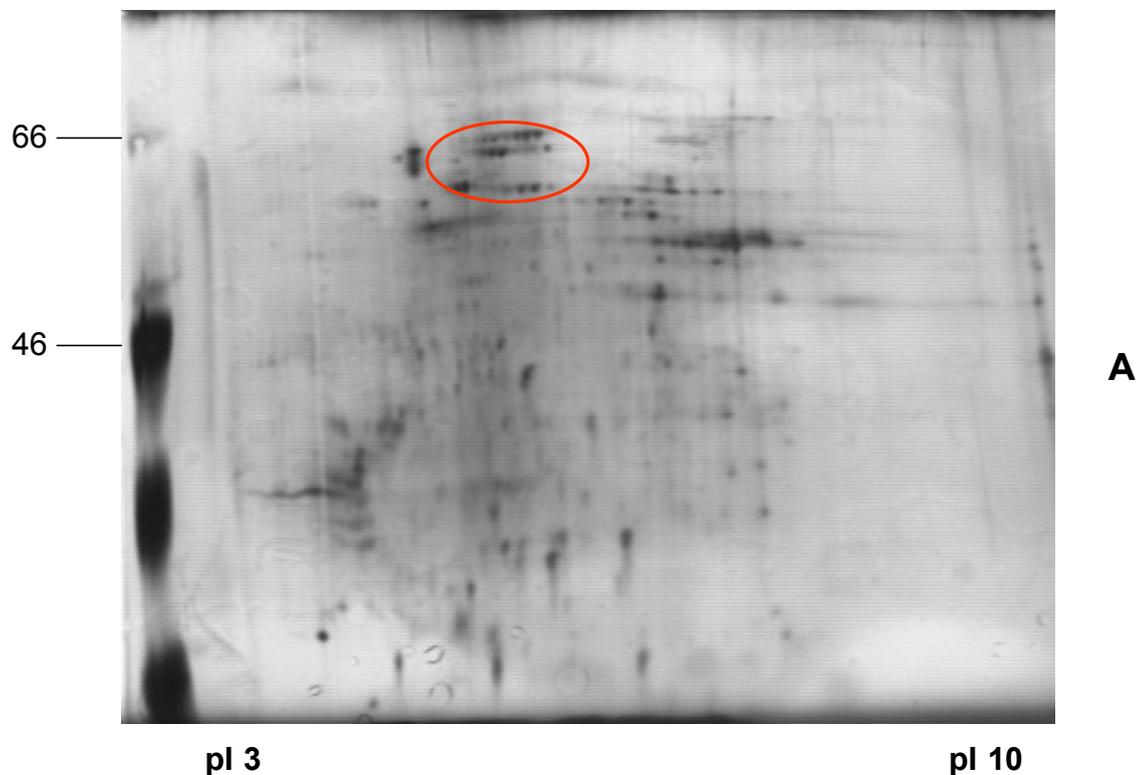


Abb. 38A 2-dimensionale Gelelektrophorese der Bottom-Fraktion eines Probanden. 200 µg Protein wurden auf einem 24 cm Strip mit einem Gradienten von 3-10 fokussiert und anschließend elektrophoretisch auf einem Precast 12,5% SDS-Gel (Amersham-Pharmacia) aufgetrennt. Danach erfolgte eine Silberfärbung mit dem Kit von Amersham Pharmacia. Der rot markierte Bereich kennzeichnet ein markantes Proteinmuster, welches in Abb. B ebenfalls wieder gekennzeichnet ist.

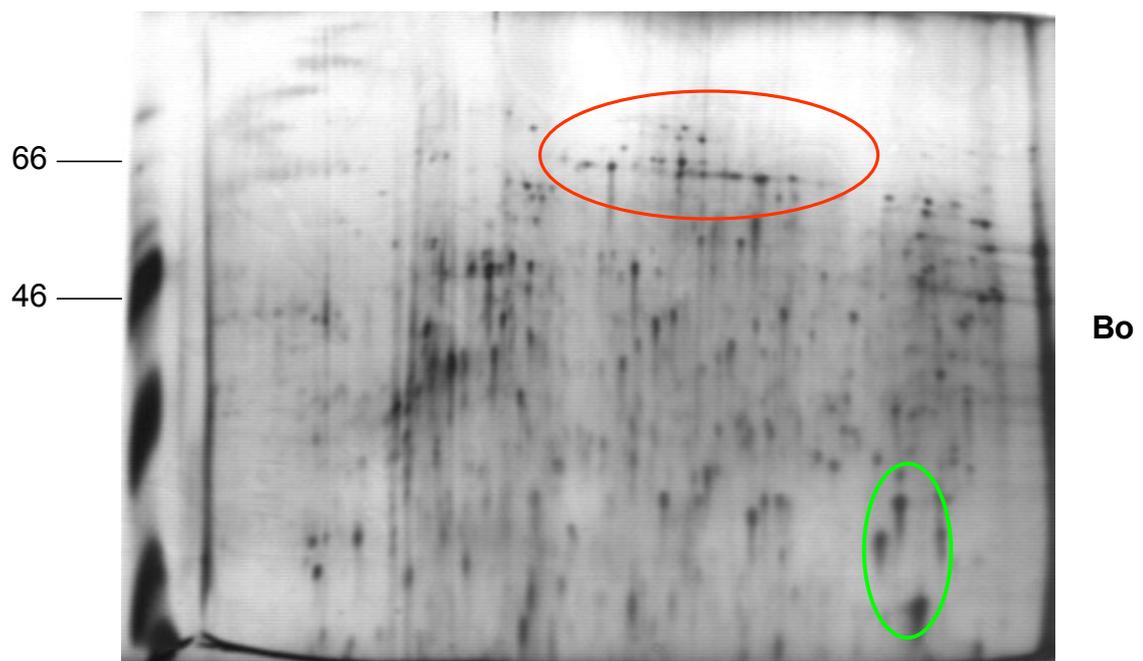
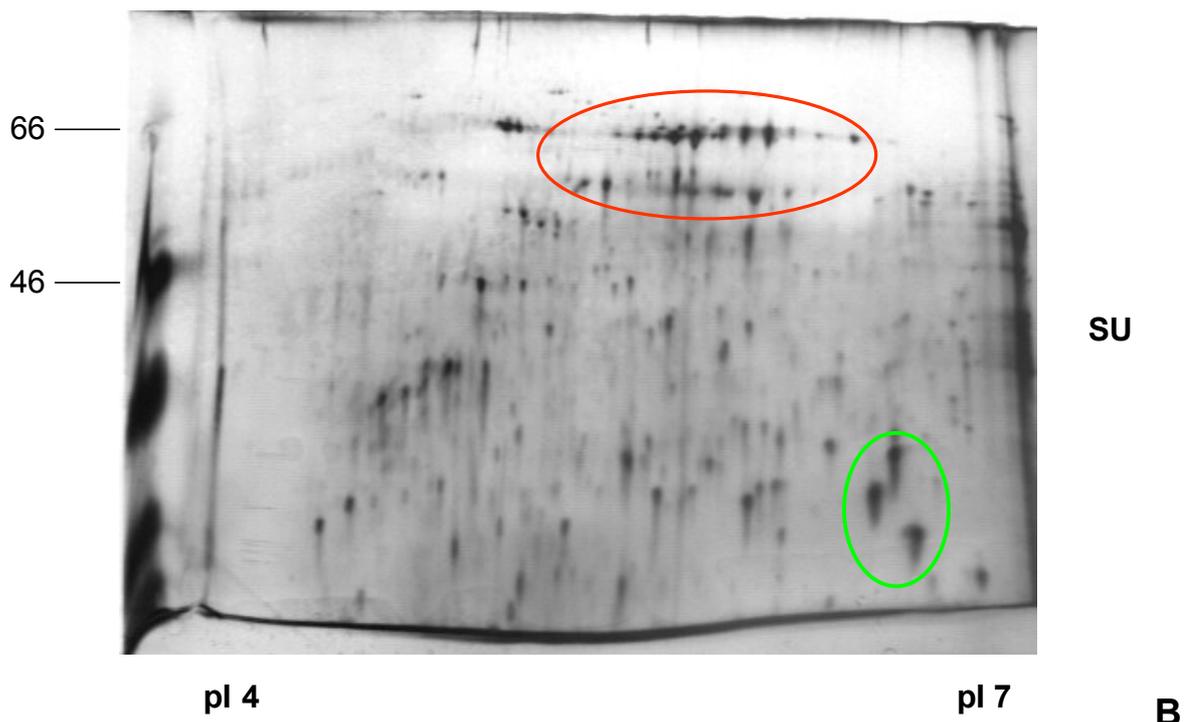


Abb. 38B 2-dimensionale Gelelektrophorese der Swim-Up- und Bottomfraktion eines Probanden. Je 200µg Protein wurden auf einem 24 Strip mit einem Gradienten von 4-7 fokussiert und anschließend elektrophoretisch auf einem Precast 12,5% SDS-Gel (Amersham Pharmacia) aufgetrennt. Danach erfolgte eine Silberfärbung mit dem Kit von Amersham Pharmacia. Der rot markierte Bereich kennzeichnet das markante Proteinmuster aus Abb. A. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass die Spots über den kleineren pH-Gradienten besser aufgetrennt werden. Auch bei diesem Probanden zeigt sich, dass wie in Abb. 36A diese Proteine deutlich geringer in den immotilen Spermien exprimiert sind. Der grün markierte Bereich kennzeichnet Spots, die in Swim-Up und Bottom-Fraktion eine gleiche Intensität aufweisen.

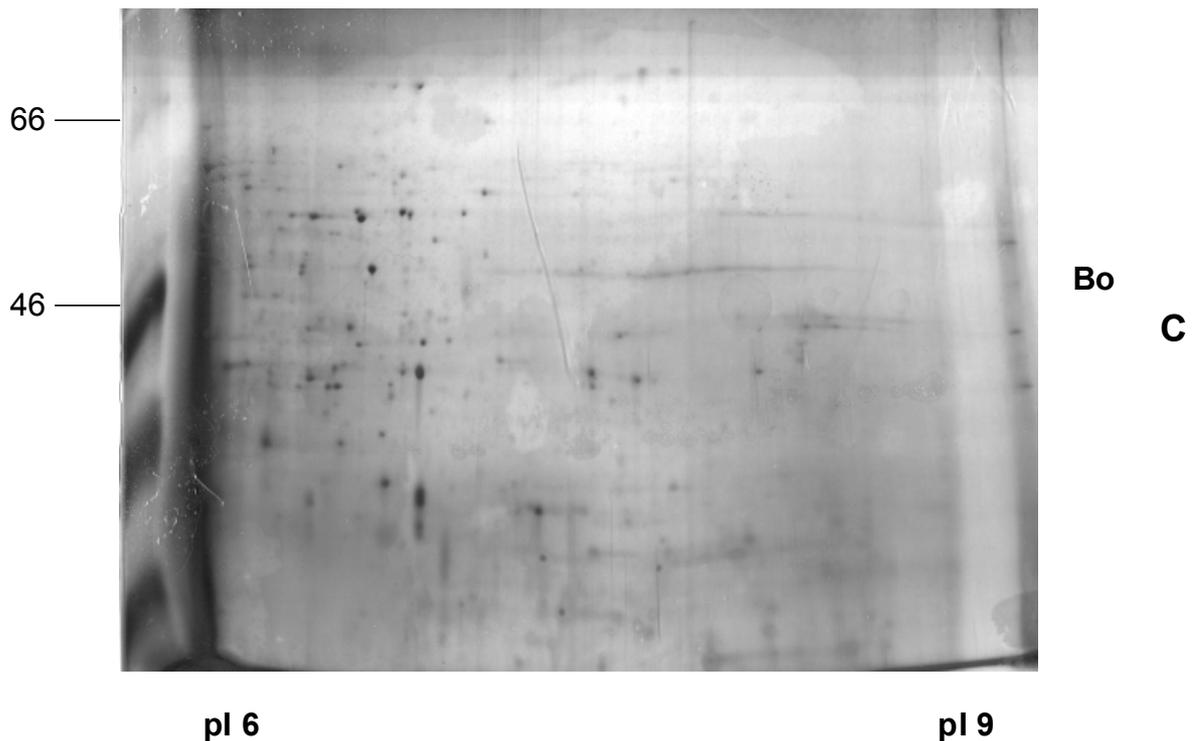


Abb. 38C 2-dimensionale Gelelektrophorese der Bottomfraktion des selben Probanden wie in A und B. 200 µg Protein wurden auf einem 24 cm Strip mit einem Gradienten von 6-9 fokussiert und anschließend elektrophoretisch auf einem Precast 12,5% SDS-Gel (Amersham Pharmacia) aufgetrennt. Danach erfolgte eine Silberfärbung mit dem Kit von Amersham Pharmacia. Wie zu erkennen ist, ist die Auflösung im basischen pH-Bereich nicht sehr gut.

3.5.4 Unterschiede in der Proteinexpression nach Inkubation mit 8-Br-cAMP und Zink

Als nächstes wurden humane Swim-Up-Spermien mit 8-Br-cAMP oder Zink inkubiert. Nach Auftrennung der Proteine mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese und anschließender MALDI-kompatibler Silberfärbung zeigten sich Unterschiede zwischen den stimulierten und den nicht-stimulierten Proben (Abb. 39). Sowohl nach der Inkubation mit 8-Br-cAMP als auch mit Zink nimmt eine Bande bei ca. 66 kDa deutlich zu (1). Unterschiede ergeben sich auch in der Region 2. Nach der Stimulation mit 8-Br-cAMP zeigen sich im Bereich > 66 kDa Proteine, die nicht in der Kontrolle (3) zu erkennen sind. Die grün markierten Bereiche 4 und 5 zeigen, dass die Gele generell nicht unterschiedlich gefärbt wurden.

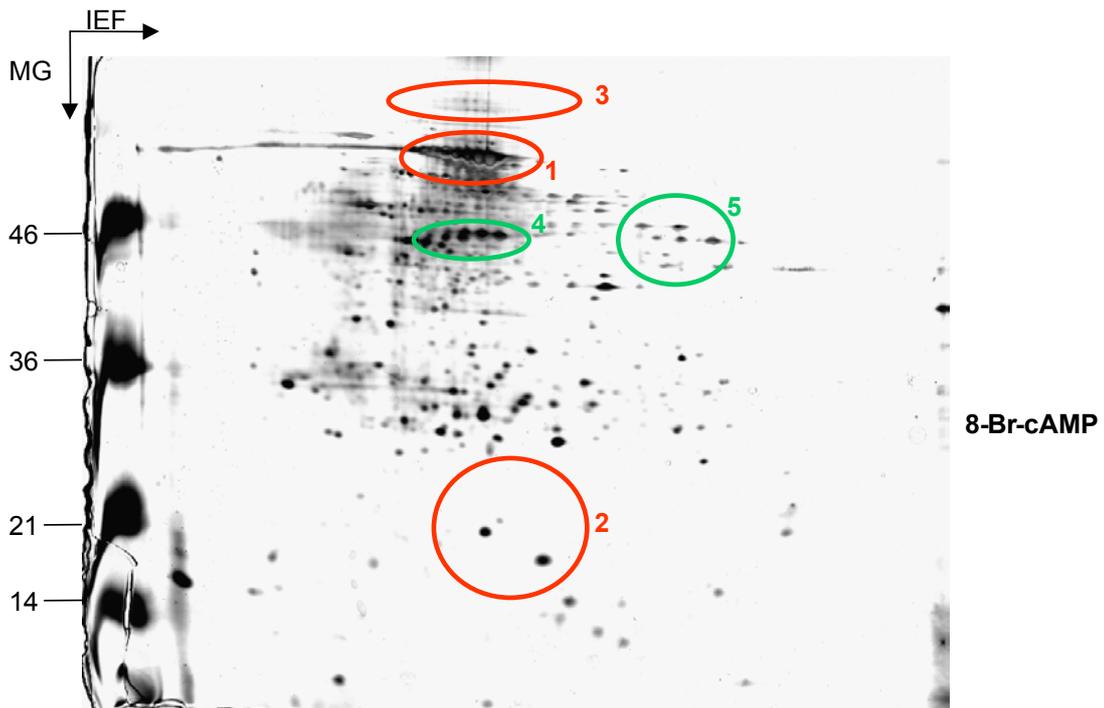
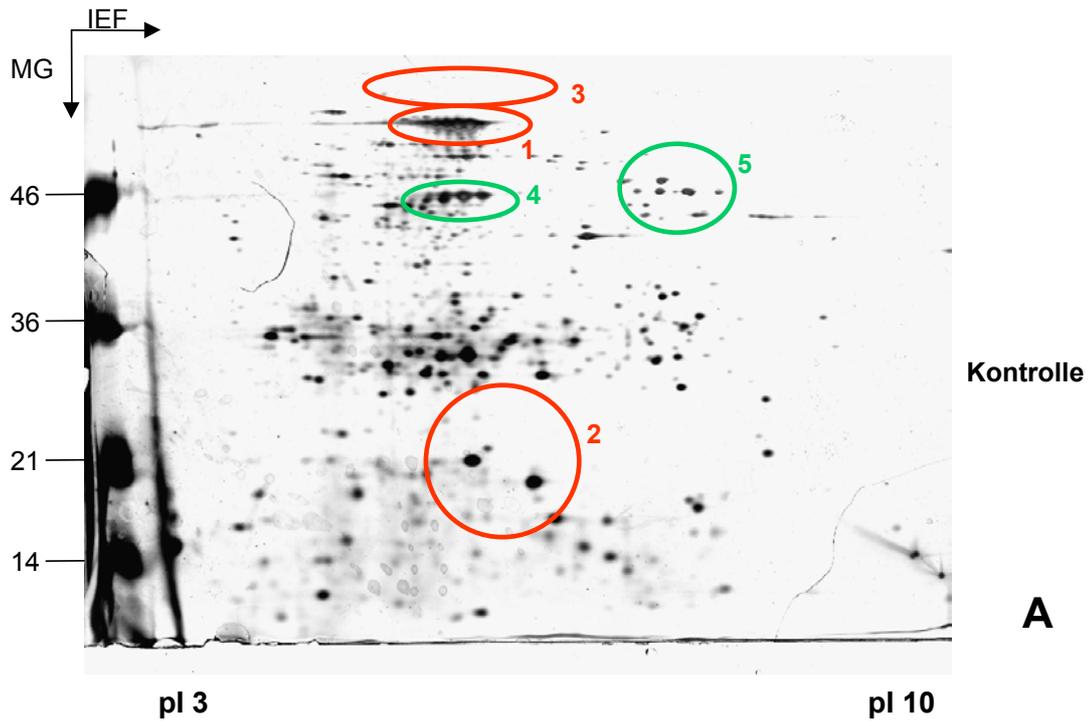


Abb. 39A 2-dimensionale Gelelektrophorese humaner Swim-Up-Spermien. Die Spermien wurden 1.5 Stunden bei 37°C im Wasserbad mit 8-Br-cAMP oder Zink (jeweils 1 mM) stimuliert, homogenisiert, auf einem pH-Gradienten pH 3-10 fokussiert und anschließend auf einem 12,5% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden dann nach der MALDI-kompatiblen Silberfärbung gefärbt und eingescannt. Die rot markierten Bereiche kennzeichnen unterschiedlich stark gefärbte Proteine, die grün markierten Bereiche kennzeichnen hingegen gleich stark angefärbte Proteine.

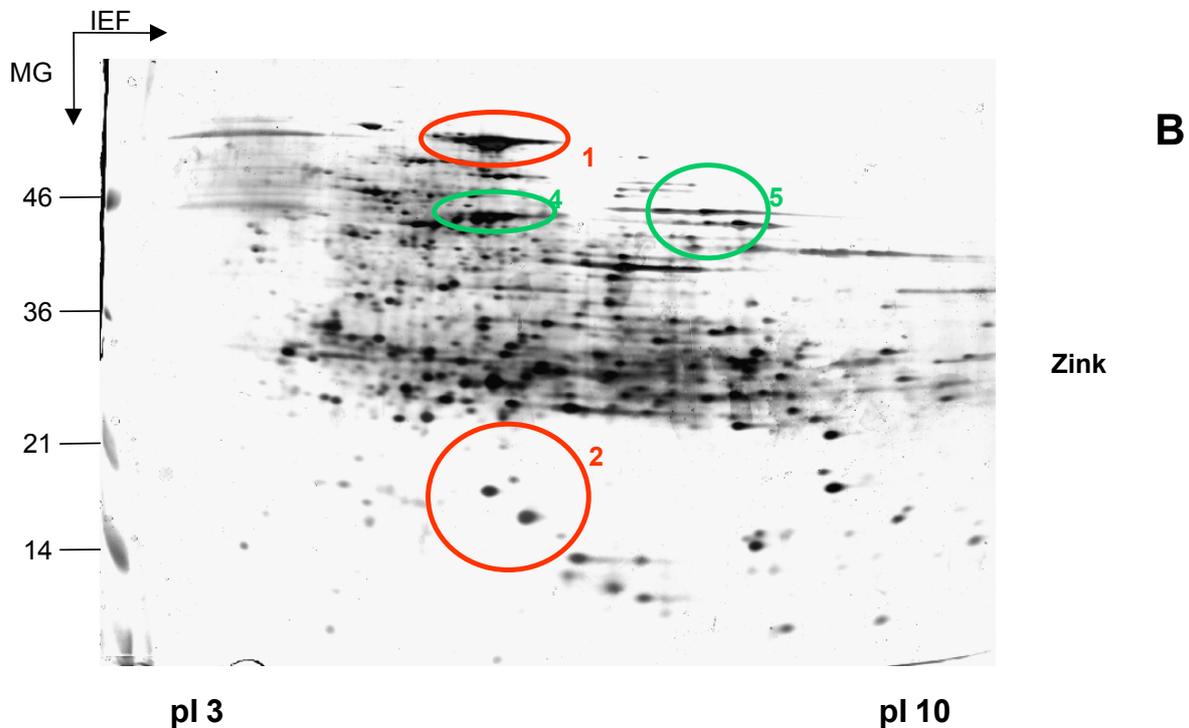


Abb. 39B 2-dimensionale Gelelektrophorese humaner Swim-Up-Spermien. Die Spermien wurden 1.5 Stunden bei 37°C im Wasserbad mit 8-Br-cAMP oder Zink (jeweils 1 mM) stimuliert, homogenisiert, auf einem pH-Gradienten pH 3-10 fokussiert und anschließend auf einem 12,5% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden dann nach der MALDI-kompatiblen Silberfärbung gefärbt und eingescannt. Die rot markierten Bereiche kennzeichnen unterschiedlich stark gefärbte Proteine, die grün markierten Bereiche kennzeichnen hingegen gleich stark angefärbte Proteine.

3.5.5 Phosphotyrosin-Immunoblot nach vorheriger 2-dimensionaler Elektrophorese

Wie die Abbildungen 19 und 21 zeigen, stimulieren 8-Br-cAMP und Zink die Tyrosinphosphorylierung bestimmter Spermienproteine. Abbildung 39 zeigt, dass der Effekt dieser Agenzien auch nach 2-dimensionaler Gelelektrophorese und Silberfärbung detektierbar ist. Darum wurden darüber hinaus Versuche unternommen, Phosphotyrosin-Proteine auch nach 2-dimensionaler Gelelektrophorese mittels Western-Blot zu identifizieren. Da die GSK-3 einen

theoretischen pI von mehr als 10 aufweist (Swiss Prot, Calc pI), und Abb. 38C die deutliche Limitation dieser Methode im basischen pH-Bereich aufweist, wurden keine Versuche unternommen, dieses Protein im 2d-Blot zu identifizieren.

Um eine möglichst große Menge an Protein einsetzen zu können, wurde dieser Versuch auf 7cm Strips mit dem pH-Gradienten 3-10 durchgeführt. Abb. 40 zeigt das Silbergel und den Phosphotyrosin-Westernblot der 2d-Elektrophorese. Deutlich zu erkennen ist auf dem Silbergel (A) die 67 kDa-Reihe. Im Western-Blot (B) sind einzelne kleine Spots bei ca. 97kDa zu erkennen, die im Silbergel nur sehr schwach zu erkennen sind. Dafür sind in Abb. 41 A bei der Stimulation mit 8-Br-cAMP im Silbergel im mit 3-markierten Bereich (ca. pH 4-5 im passenden Molekulargewichtsbereich) ebenso Proteine zu erkennen, die in unstimulierten Spermien nicht zu detektieren sind.

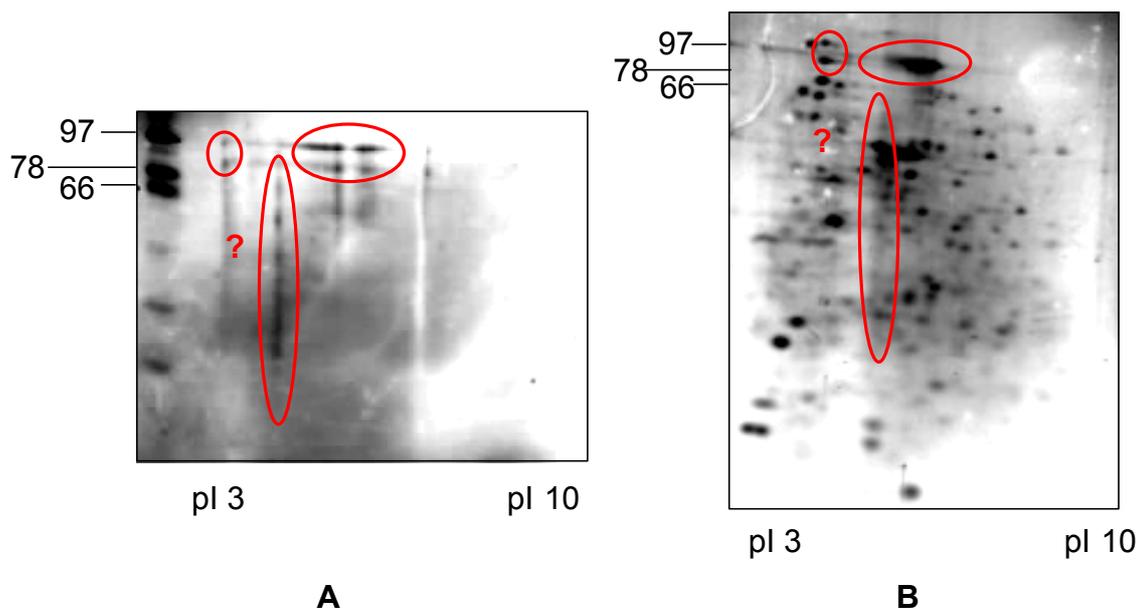


Abb. 40 Silberfärbung (B) und Phosphotyrosin-Western-Blot einer 2-dimensionalen Gelelektrophorese mit humanen Swim-Up-Spermien. Swim-Up-Spermien wurden für 1.5 Stunden mit 8-Br-cAMP stimuliert, homogenisiert und auf einem 7cm Strip mit einem pH-Gradienten von 3-10 fokussiert, bevor sie auf einem 8% Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Gel A wurde daraufhin geblottet und es erfolgte eine Immunodetektion mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper 4G10. Gel B wurde hingegen 1 Stunde fixiert und daraufhin Silber gefärbt. Eine Zuordnung der Phosphotyrosin-Proteine zu den silbergefärbten Spots erwies sich als schwierig, da keine gleichen Muster zu erkennen sind. Die roten Markierungen zeigen Bereiche auf, die anhand des Molekulargewichtes und des pH-Bereiches in Frage kommen könnten.

3.5.6 Identifizierung einzelner Proteine nach 2-dimensionaler Elektrophorese und anschließender Silberfärbung

In dieser Arbeit war es gelungen, anhand der Methode der 2-dimensionalen Gelelektrophorese das Proteom der Spermien bei verschiedenen pH-Gradienten darzustellen und Unterschiede im Proteinmuster von motilen und immotilen Spermien aufzuzeigen (s. Abb. 36A, B und C). Der nächste Schritt war nun, markante Proteine zu identifizieren, die in immotilen und motilen Spermien unterschiedlich exprimiert sind. In Abb. 41 sind 3 Proteine markiert, die nach Trypsinierung mittels Massenspektrometer-Analyse (MALDI-TOF) identifiziert werden konnten.

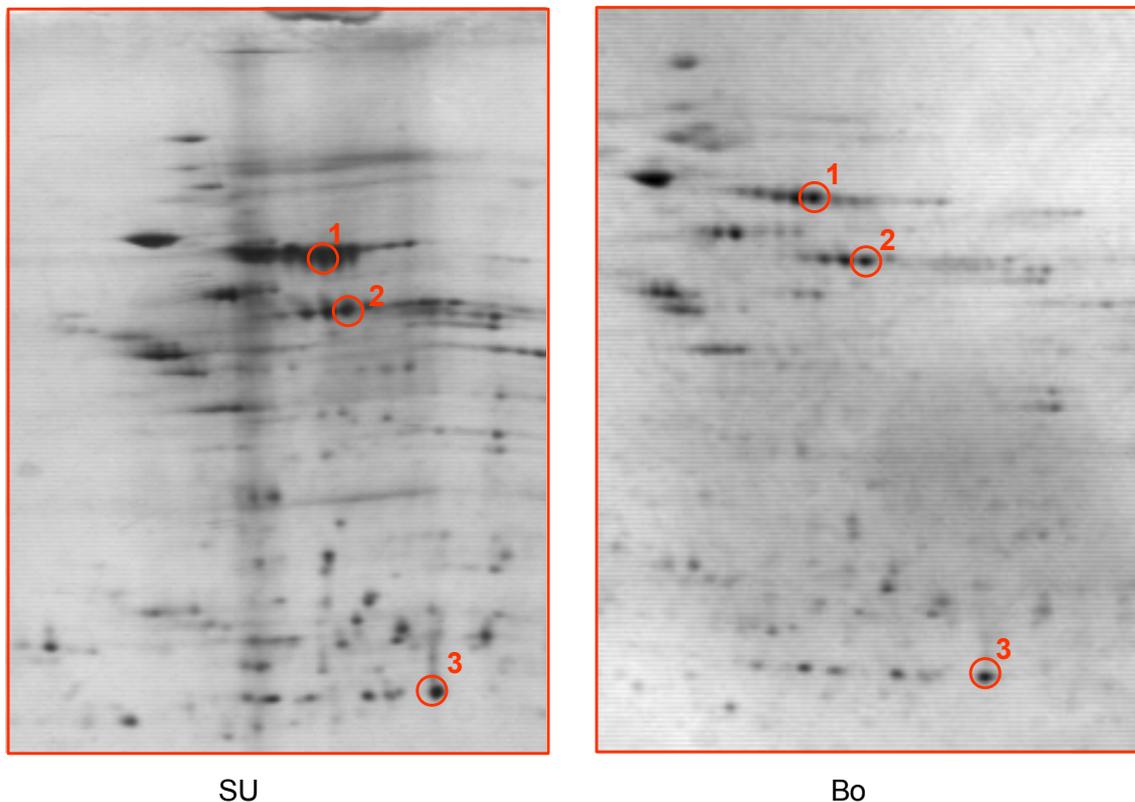


Abb. 41 2-dimensionale Elektrophorese humaner Spermien. Die rot markierten Bereiche zeigen Spots, die gepickt, verdaut und anschließend im MALDI-TOF sequenziert wurden.

Die Identifizierung der Spots ergab folgende Ergebnisse:

Spot 1 hat ein ermitteltes Molekulargewicht von >70000 Da und einen ermittelten pI von $6 \pm 0,2$.

Die Identifizierung im MALDI-TOF mit anschließender Datenbanksuche ergab, dass es sich bei diesem Spot um den Albumin Precursor (human) handelt. Abb. 42 zeigt den Vergleich der gefundenen Peptide mit der Sequenz in der Datenbank (www.expasy.ch). Die Ergebnisse wurden von der Firma Micromass per MS/MS-Analyse bestätigt.

```
1  mkwvtfisll flfssaysrg vfrrdahkse vahrfkdlge enfkalvlia faqylqqcpf
61  edhvklvnev tefaktcvad esaencdksl htlfgdklct vatlretyge madccakqep
121 ernecflqhk ddnplprlv rpevdvmcta fhdneetflk kylyeiarrh pyfyapellf
181 fakrykaaft eccqaadkaa clpkldelr degkassakq rlkcaslqkf gerafkawav
241 arlsqrfpka efaevsklvt dltkvhtecc hgdllcadd radlakyice nqdsissklk
301 eccekpllek shciaevend empadlpsla adfveskdvc knyaeakdvf lgmflyeyar
361 rhpdyvlll lrlaktyett lekccaaadp hecyakvfde fkplveepqn likqncelfe
421 qlgeykfna llvrytkkvp qvstptllev srnlgkvgsk cckhpeakrm pcaedylsvv
481 lnqlcvlhek tpsdrvtkc cteslvnrrp cfsalevdet yvpkefnaet ftfhadictl
541 sekerqikkq talvelvkhk pkatkeqlka vmddfaafve kckaddket cfaeegkklv
601 aasqaalgl
```

Abb. 42 Vergleich der im MALDI-TOF identifizierten Peptide aus Spot 1 mit der Sequenz des humanen Albumin-Precursors. Übereinstimmungen in der Sequenz sind blau gekennzeichnet.

Spot 2 hatte ein ermitteltes Molekulargewicht zwischen 46000 und 66000 Da und einen pI von $7 \pm 0,2$.

Die Identifizierung im MALDI-TOF mit anschließender Datenbanksuche ergab, dass es sich bei diesem Spot um Keratin I (human) handelt. Abb. 44 zeigt den Vergleich der gefundenen Peptide mit der Sequenz des Keratins (www.expasy.ch).

Auch diese Befunde wurden von der Firma Micromass mit einer anschließenden MS/MS Untersuchung bestätigt.

```
1  msrqfssrsg yrsgggfssg sagiinyqrr tssstrrsg ggggrfssc ggggsfgagg
61  gfgsrslvnl ggsksisv argggrsgsf ggyggggfg gggfgggfg gggigggfg
121 gfgsgggfg gggfggggyg ggygpvcppg giqevting llqplnveid peiqkvsre
181 reqikslnnq fasfidkvr f leqqnqvlqt kwellqqvdt strthnlepy fesfinlrr
241 rvdqlksdqs rldselknmq dmvedyrnky edeinkrtna enefvtikkd vdgaymtkvd
301 lqakldnlqq eidflalyq aelsqmqqi setnvilsm nnrslldsi iaevkaqyed
361 iaqskaeae slyskyeel qitagrgds vrnskieise lnrviqlrs eidnvkkqis
421 nlqssisdae qrgenalkda knklndleda lqqakedlar llrdyqelmn tkldleia
481 tyrtllegee srmsgecapn vsvsvststht tisgggrsg ggggygsggs sygsggsg
541 sgggggggrg sygsggssyg sgggsygs gggghgsygs gsssyyrgg sggggggsg
601 grgsgggsg gsiggrgsss ggvkssgss svrfvsttys gvtr
```

Abb. 44 Vergleich der im MALDI-TOF identifizierten Peptidfragmente aus Spot 2 mit der Sequenz humanen Keratins Typ I. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die im MALDI identifizierten Sequenzen.

Spot 3 hatte ein ermitteltes Molekulargewicht von ca. 25000 Da und einen isoelektrischen Punkt von $6,8 \pm 0,2$.

Die Identifizierung im MALDI-TOF mit anschließender Datenbanksuche ergab, dass es sich bei diesem Spot um die regulatorische Untereinheit des RNA-binding Proteins handelt. Abb. 45 zeigt den Vergleich der gefundenen Peptide mit der Sequenz des RNA-binding protein, regulatorische Untereinheit.

1 maskralvil akgaemetv ipvdvmr rag ikvtvaglag kdpvqcsrdv vicpdasled
61 akkegpydvv vlpggnlgaq nlsesaavke ilkeqenrkg liaaicagpt allaheigfg
121 skvtthplak dkmmngghyt ysenrvekdg liltstrgppt sfefalaive alngkevaaq
181 vkap lvlkd

Abb. 45 Vergleich der im MALDI-TOF identifizierten Peptidfragmente aus Spot 3 mit der Sequenz des humanen RNA-binding Proteins, regulatorische Untereinheit. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die im MALDI identifizierten Sequenzen.

In dieser Arbeit konnten somit 3 Proteine aus dem Proteom humaner Spermien identifiziert werden, von denen der human Serum Albumin Precursor und das Keratin 1 weitaus stärker in den motilen Spermien exprimiert zu sein scheinen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die identifizierten Proteine und deren theoretischen sowie in der 2-dimensionalen Gelelektrophorese ermittelten Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte.

Spot	Name des Proteins	pI _{theoret.}	pI _{ermittelt}	MG _{theoret}	MG _{ermittelt}
1	Human Serum Albumin Precursor	5,92	6 ±0,2	69348	> 70000
2	Keratin I (epidermolytic hyperkeratosis)	8,1	7 ±0,2	66017	Zwischen 46000 u 66000
3	RNA binding protein regulatory subunit	6,33	6,8 ±0,2	19873	ca. 25000

Tab.1 Identifizierte Proteine in humanen Spermien und ihre theoretischen sowie praktisch ermittelten Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte.

4. Diskussion

4.1 Adenylatzyklase- und Guanylatzyklase-Aktivität

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Adenylatzyklase- und Guanylatzyklase-Aktivität sowohl in der partikulären als auch in der cytosolischen Fraktion humaner Spermien nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse (Abbildungen 14 und 18) zeigen, dass die basalen cAMP-Spiegel humaner Spermien im pmol-Bereich, die cGMP-Spiegel jedoch nur im fmol-Bereich liegen. Die Probe eines einzigen Probanden zeigte einen wesentlich höheren basalen cGMP-Spiegel. Eine Korrelation zwischen den cAMP- und cGMP-Spiegeln scheint generell nicht vorzuliegen. Auch zeigen die Probanden eine hohe Variation der basalen Spiegel an unterschiedlichen Spendentagen, obwohl die Ejakulate immer gleich behandelt wurden. Ein direkter Zusammenhang zwischen den basalen Spiegeln der zyklischen Nukleotide und der Motilität der Spermien erscheint daher unwahrscheinlich. Dies ist nicht verwunderlich, da Spermien keine Translations- und Transkriptionsaktivität haben. Die gesamten Prozesse der Kapazitation und Akrosomen-Reaktion müssen somit über posttranslationale Modifikationen geregelt werden. Hierbei kommt dem intrazellulären Botenstoff cAMP eine hervorragende Rolle zu. Allerdings dürfen Signaltransduktionskaskaden nicht zu früh aktiviert werden, da sonst womöglich Kapazitation und Akrosomen-Reaktion vorzeitig eingeleitet werden könnten, wodurch einem Spermium jegliche Möglichkeit genommen würde, die Eizelle zu befruchten. Die Adenylatzyklase-Aktivität humaner Spermien ist durch divalente Kationen wie Mg^{2+} und (noch stärker) Mn^{2+} aktivierbar (Okamura et al., 1983; Hildebrandt et al., 1985; Rojas et al., 1992). Eine Stimulation mit Mn^{2+} kann dabei eine Stimulation durch Hormone überdecken. Vergleicht man die durch Mg^{2+} und Mn^{2+} stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität humaner Spermien mit der in Vergleichsgewebe (humaner cerebraler Cortex und humanem Hoden, Abb. 11), zeigt sich, dass die Aktivität der partikulären Adenylatzyklase in Spermien mit der im Hoden und die der cytosolischen mit der im cerebralen Cortex vergleichbar ist. Anders sieht die Situation für die Guanylatzyklase-Aktivität der Spermien aus. Auch diese ist in stärkerem Maße durch Mn^{2+} als durch Mg^{2+} aktivierbar, doch ist die Aktivität sehr viel geringer als im cerebralen Cortex oder im Hoden (Abb. 11). Die partikuläre Guanylatzyklase ließ sich durch keines der bekannten natriuretischen Peptide (ANP, BNP und CNP Brenner et al., 1990; Ruskoaho, 1992)

aktivieren. Dieses Ergebnis war überraschend, denn in unserer Arbeitsgruppe konnte anhand von UV-Crosslinking-Experimenten, bei denen mit Iod¹²⁵-markiertes ANP als Ligand eingesetzt wurde, gezeigt werden, dass in Spermienhomogenaten frisch ejakulierter Spermien ein Rezeptor für ANP (GC-A) vorliegt (unveröffentlichtes Ergebnis). Die Tatsache, dass ich keine Stimulierung durch ANP beobachten konnte, ließe sich damit erklären, dass dieser Rezeptor modifiziert vorliegt. So könnte sich die Aktivität des Rezeptors während der Passage durch den weiblichen Genitaltrakt und dabei vermutlich durch die Änderungen in der Membranzusammensetzung der Spermien während der Kapazitation und Akrosomen-Reaktion verändern. Es ist aber nur schwer möglich, den Zustand der Membran in Spermien zu überprüfen. Man kann zwar überprüfen, ob ein Spermium bereits Akrosomen-reagiert ist (Chacarov et al., 1976), aber erste Membranveränderungen treten bereits während der Kapazitation ein. Potter et al. beschrieben, dass die Stimulierbarkeit des Rezeptors deutlich nachließ, sobald der Rezeptor dephosphoryliert wurde (Potter et al., 1992, 1994, 1998). Die Arbeitsgruppe postuliert eine Desensibilisierung infolge der Dephosphorylierung des Rezeptors GC-A innerhalb der Kinase-Homologie Domäne. Die Gruppe konnte auch zeigen, dass eine Konvertierung von vier oder mehr der Phosphorylierungsstellen zu Alanin zu einem Hormon-insensitiven Rezeptor führt. Da in Spermien Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen zur Vermittlung von Signalen eine große Rolle spielen, könnte GC-A, in Spermien durch reversible Phosphorylierung reguliert und nur in bestimmten Phasen stimulierbar sein.

SNP, ein NO-Donor, hingegen konnte die Guanylatzyklase-Aktivität in humanen Spermien aktivieren. NO ist ein Aktivator der löslichen Guanylatzyklase. Es gibt in der Literatur sowohl Berichte über die Aktivität einer löslichen Guanylatzyklase in Spermien als auch Berichte, die eine Rolle von NO bei der Akrosomen-Reaktion aufzeigen können. (Roselli et al., 1998; Ravelli et al., 1999, 2001). Diese Befunde deuten auf eine Funktion der löslichen Guanylatzyklase hin.

Da Zink die Tyrosinphosphorylierung der Spermienproteine ähnlich wie cAMP verstärkte und der PKA-Inhibitor H89 diesen Effekt blockierte, wurde untersucht, ob Zink in humanen Spermien auch einen Einfluss auf die Aktivität der Adenylatzyklase hat. Wie die Abbildung 12 zeigt, aktiviert Zink die Adenylatzyklase zeit- und konzentrationsabhängig. Dies bedeutet, dass Zink den Effekt von cAMP noch potenzieren kann, da es zu einer vermehrten Bildung des intrazellulären Botenstoffes kommt. Eine Aktivierung der Adenylatzyklase durch Zink konnte bereits in Spermien von

Eber und Bulle gezeigt werden (Braun 1975; Goh et al., 1988). Diese Aktivierung scheint jedoch eine spezifische Eigenschaft der Spermien-Adenylatzyklase zu sein, denn in somatischen Geweben hemmt Zink die Adenylatzyklase-Aktivität. Dies wurde von Tesmer et al., 1999 beschrieben und auch in dieser Arbeit gezeigt. Abb. 13 zeigt, dass die Aktivierung der Adenylatzyklase in Spermien durch Zink sogar noch stärker als die durch Magnesium ist. In MA-10 Zellen wird die Adenylatzyklase durch Zink in sehr geringem Maße, jedoch auch sehr viel weniger als durch Magnesium aktiviert. In Homogenaten der Rattenlunge, also einem somatischem Gewebe ist hingegen die Inhibierung der Adenylatzyklase-Aktivität durch Zink deutlich sichtbar. Dies könnte in Kombination mit dem bekannten Phänomen, dass eine Zink-Defizienz zu Hypogonadismus führt, darauf schließen lassen, dass Zink eine wichtige Rolle im Hoden spielen könnte. Die Guanylatzyklase-Aktivität ließ sich hingegen weder in der cytosolischen noch in der partikulären Fraktion humaner Spermien durch Zink aktivieren.

4.2 Tyrosinphosphorylierung

Wie unter 1.4 beschrieben, ist eine Tyrosinphosphorylierung von Proteinen in Spermien ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Vorbereitung der Akrosomen-Reaktion (Leclerc et al., 1996; Emiliozzi et al., 1997). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass cAMP die Tyrosinphosphorylierung induziert. Aber auch Zink, das im Seminalplasma in sehr hohen Konzentrationen bis zu 2mM vorliegen kann, induziert die Tyrosinphosphorylierung. Die Rolle von Zink bei der Regulation von Spermienfunktionen wird kontrovers diskutiert. So wird Zink eine Rolle bei der Stabilisierung von Spermienmembranen und somit indirekt ein inhibitorischer Effekt auf Kapazitation und Akrosomen-Reaktion zugeschrieben (Riffo et al., 1992; Andrews et al., 1994). Schaefer et al. (1998) sehen in Zink einen Ca^{2+} -Ionenkanalblocker. Es gibt Berichte, dass die Behandlung von Spermien mit Seminalplasma die Tyrosinphosphorylierung humaner Spermien inhibiert (Tomes et al., 1998). Fest steht, dass Zink-Defizienz während der Entwicklung zur Nekrose der Keimzell-Vorläufer und somit zu einem Hypogonadismus

führt (Merker und Günther, 1997). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten zum ersten Mal, dass Zink die Tyrosinphosphorylierung in humanen Spermien *in vitro* zeit- und konzentrationsabhängig stimuliert. Dass Zink jedoch einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Proteinen ausüben kann, ist von mehreren Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Zusammenhängen beschrieben worden. So beschrieben Shuster et al. 1996, dass Zink einen deutlichen Einfluss auf die Phosphorylierung von Rhodopsin in der Retina ausüben kann. Hierbei bindet Zink an Rhodopsin und begünstigt damit offenbar die Bindung und Aktivität der Rhodopsin-Kinase. Andere Arbeitsgruppen berichten über einen Einfluss von Zink auf die Phospholamban (PLB)-Phosphorylierung (Baltas et al., 1997). Phospholamban liegt im sarkoplasmatischen Retikulum des Herzens vor und ist ein Inhibitor der Ca^{2+} -Pumpe im Herzen. Hierbei inhibiert Zink allerdings konzentrationsabhängig die PLB-Phosphorylierung am Threonin 17, nicht jedoch am Serin-16. Die Inhibierung führt zu einer erhöhten Affinität der Pumpe für Ca^{2+} . Dies zeigt nicht nur, dass Zink den Effekt auf die Phosphorylierung von Proteinen sehr spezifisch ausüben kann, sondern auch, dass Zink in anderen Organen einen Einfluss auf den Kalzium-Haushalt ausübt, welcher in Spermien essentiell für Motilität und Fertilität ist. Die Induzierung der Tyrosinphosphorylierung durch cAMP und Zink konnte durch Zusatz des spezifischen PKA-Inhibitors H-89 blockiert werden. Ersteres beweist, dass, wie in der Literatur bereits diskutiert, cAMP über den PKA-Signalweg zur Tyrosinphosphorylierung führt (Visconti et al., 1995). Aber auch Zink scheint einen Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung ebenfalls über den PKA-Signalweg zu vermitteln. Der Botenstoff cGMP konnte die Tyrosinphosphorylierung in humanen Spermien nicht induzieren, obwohl er eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu cAMP aufweist. Von einigen Proteinkinasen wie der PKA ist bekannt, dass sie von beiden zyklischen Nukleotiden aktiviert werden können, also eine sogenannte Crossaktivierung erfolgen kann (Jiang et al., 1992). In diesen Fällen sind jedoch sehr viel höhere Konzentrationen des normalerweise nicht bevorzugten zyklischen Nukleotides notwendig. Da in meiner Arbeit beide zyklischen Nukleotide in derselben Konzentration eingesetzt wurden, ist eine Crossaktivierung weitgehend ausgeschlossen. Die Proteine in menschlichen Spermien werden daher ausschließlich durch cAMP-vermittelte Reaktionen tyrosinphosphoryliert.

4.3 GSK-3 in Spermien

GSK-3 ist eine konstitutiv aktive, cytosolische Serin/Threonin Kinase. Das Enzym existiert in zwei Isoformen, GSK-3 α (51 kDa) und GSK-3 β (46 kDa). GSK-3 wurde zuerst im Zusammenhang mit dem metabolischen Weg der Glycogen-Synthase-Regulation beschrieben, welche sensitiv gegenüber einer Insulin-medierten Inhibierung ist (Plyte et al., 1992). GSK-3 ist ein während der Evolution hoch konserviertes Protein. Plyte et al. (1992) zeigten, dass GSK-3 in allen untersuchten eukaryotischen Spezies (u.a. Mensch, Affe, Schwein, Ratte, Huhn, Drosophila und Hefe) vorkam. Auch in Pflanzen (*Arabidopsis*) konnte eine GSK-3 nachgewiesen werden. Eine unterschiedliche Verteilung der beiden Isoformen konnte Lau et al. (1999) aufzeigen. Dabei zeigte sich ein Vorkommen der GSK-3 α überwiegend in Lunge, Ovar, Niere und Hoden, während GSK-3 β in Lunge, Niere und Gehirn exprimiert wird. Die Aktivität der GSK-3 wird durch Phosphorylierungen reguliert. So führt eine Tyrosinphosphorylierung an Tyr 279 (GSK-3 α) bzw. Tyr 216 (GSK-3 β) zu einer Aktivierung der GSK-3, während Serinphosphorylierung an Ser 21 (GSK-3 α) bzw. an Ser 9 (GSK-3 β) und nicht etwa eine Dephosphorylierung der Tyrosinreste zu einer Inaktivierung des Enzyms führt (Shaw et al., 1997).

Obwohl eine unterschiedliche Verteilung der beiden Isoformen von Lau beschrieben wurde, sind die Funktionen der GSK-3-Isoformen in diesen Geweben weitgehend unerforscht. Doch 1996 beschrieben Vijayaraghavan et al. eine Spermien-spezifische Serin/Threonin Phosphatase (PP1 γ 2) und ihre Modulatoren I2 und GSK-3 in epididymalen bovinen Spermien und schrieben ihnen eine Rolle bei der Regulation der Motilität zu, da beide Enzym-Aktivitäten während der Passage durch die Epididymis abnehmen. Im Jahr 2000 zeigte die Arbeitsgruppe per Immunhistologie, dass GSK-3 im Flagellum und in der anterior-Region des Spermienkopfes boviner Spermien lokalisiert ist.

Diese Befunde waren so interessant, dass im Folgenden geklärt werden sollte, ob und welche Rolle die GSK-3 bei der Regulation der Motilität humaner Spermien hat.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Isoformen der GSK-3 in humanen Spermien exprimiert sind. Dabei ist kein Unterschied in der Expression der Isoformen zwischen motilen und immotilen Spermien detektierbar (Abb. 24). Da in Spermien

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen bei der Regulation der Signaltransduktion eine essentielle Rolle spielen, wurden als nächstes Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus der GSK-3 durchgeführt. Hierbei waren Analysen der Serinphosphorylierung, welche zu einer Inaktivierung des Enzyms führt, von besonderem Interesse. In dieser Arbeit konnte durch Untersuchungen mit einem Antikörper gegen die serinphosphorylierten Isoformen gezeigt werden, dass GSK-3 in humanen Spermien durch Stimulation mit cAMP und Zink serinphosphoryliert und damit inaktiviert wird (Abb. 25 und 27).

Um zu untersuchen, ob der PKA-Signalweg hierbei eine Rolle spielt, wurde der PKA-spezifische Inhibitor H-89 eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die durch cAMP induzierte Serinphosphorylierung und damit Inaktivierung der GSK-3 durch H-89 aufgehoben werden konnte, nicht aber die durch Zink induzierte (Abb. 29). Dies läßt darauf schließen, dass Zink seinen inhibitorischen Effekt über einen anderen Mechanismus ausübt.

Eine weitere in der Literatur ausführlich beschriebene Kinase, die die GSK-3 inaktivieren kann, ist die PKB (Cross et al., 1995; Kandel und Hay, 1999). Einige Rezeptoren, Kinasen und intrazelluläre Botenstoffe, die Insulinsignale vermitteln, sind in Spermien nachgewiesen worden (Vanelli et al., 1988; Silvestroni et al., 1992; Murase et al., 1995; Fisher et al., 1998; Luconi et al., 2001). In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die im Gegensatz zum Hoden, primären und Tumor-Leydigzellen und Fett aus der Epididymis in Spermien nicht nachzuweisen ist (Abb. 32). Auch in der Literatur gibt es bisher keine Hinweise auf PKB in Spermien.

Abb. 32 zeigt, dass eine weitere Kinase zum ersten Mal in Spermien nachgewiesen werden konnte, die Integrin-linked Kinase. Diese stellt eine „Ankyrin-Repeat“ enthaltende, Serin/Threonin Kinase dar, die direkt mit den cytoplasmatischen Domänen der $\beta 1$ und $\beta 3$ Integrin-Untereinheiten interagieren kann.

Auf der Suche nach möglichen Proteinen, die mit GSK-3 interagieren, wurde auch die PP2A untersucht. Eine Phosphatase-Aktivität ist als Gegenspieler zu den Kinasen bei der Regulation posttranslationaler Prozesse unerlässlich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die regulatorischen Untereinheiten der PP2A in motilen und immotilen Spermien unterschiedlich exprimiert sind. In motilen Spermien ist die B α -regulatorische Untereinheit mehr exprimiert, in immotilen Spermien die A-regulatorische Untereinheit (Abb. 33). Des Weiteren konnte ich in meiner Arbeit

zum ersten Mal zeigen, dass die inaktivierte GSK-3 α mehr in motilen als in immotilen Spermien zu detektieren ist, während der Gesamtgehalt an Enzym in beiden Spermien-Populationen gleich groß ist. Aus diesen Ergebnissen lässt sich herleiten, dass eine Motilität der humanen Spermien mit einer verminderten Aktivität dieser Isoform einhergeht.

Diese Befunde könnten auf eine Rolle der GSK-3 bei der Regulation von Motilität hindeuten. Alternativ könnte die Kinase auch in Prozessen vor und während der Gameten-Interaktion involviert sein.

Für eine Rolle bei der Regulation der Motilität spricht, dass die Arbeitsgruppe von Vijayaraghavan in bovinen Spermien ein Tyrosin-phosphoryliertes, 55 kDa großes Enzym beschreiben konnte, welches mit der Motilität boviner Spermien assoziiert ist. Dieses Enzym, welche die Arbeitsgruppe als GSK-3 identifizierte, konnte am Flagellum und an der anterior-Region des Kopfes boviner Spermien nachgewiesen werden. Die Tyrosinphosphorylierung der GSK-3 nahm in motilen caudalen Spermien gegenüber den immotilen caput Spermien zu. Allerdings zeigte die Arbeitsgruppe eine Induzierung der Tyrosinphosphorylierung und damit eine Aktivierung der GSK-3 durch cAMP. In allen bisher erschienenen Berichten, in denen ein Effekt von PKA/cAMP auf die GSK-3 Aktivität beschrieben wird, deaktiviert die PKA, welche eine Serin-Threonin Kinase ist, die GSK-3 jedoch durch Phosphorylierung an Serin-Resten (Feng et al., 2000; D'Amico et al., 2000; Li et al., 2000). Nun ist das bovine System der Signaltransduktion nur in wenigen Fällen mit dem humanen vergleichbar. Ausserdem ist die Aussage, epididymale caudale Spermien seien motil und caput Spermien immotil, meiner Meinung nach nicht aufrecht zu erhalten. Denn es handelt sich hierbei eher um Reifungsstadien, da die eigentliche progressiv-Motilität der Spermien, wie in der Einleitung beschrieben, erst nach der Ejakulation erworben wird.

Auch die Inaktivierung durch cAMP und Zink, welche die Tyrosinphosphorylierung und somit einen Marker der Fertilität in humanen Spermien induzieren, stützt die Theorie, dass die GSK-3 eine Rolle bei der Regulation der Motilität spielt. Ryves et al. beschrieben 2001, dass Lithium die GSK-3 Aktivität durch eine kompetitive Hemmung (Verdrängung von Mg²⁺) inhibiert. Vielleicht ist Zn⁺ in der Lage, an die GSK-3 zu binden und sie damit zugänglicher für eine Serin/ Threonin Kinase zu machen. Wie unter 4.1 beschrieben, übt Zink eine solche Wirkung auf das in der Retina vorhandenen Rhodopsin aus.

Eine weitere Möglichkeit zur Rolle der GSK-3 bei der Regulation der Motilität wäre eine Funktion im Energie-Metabolismus im Flagellum. Denn der Energie-Metabolismus humaner Spermien ist ein überwiegend glykolytischer Prozess (Peterson und Freund, 1968). Auch ist GSK-3 im Gehirn in der Lage, die mitochondriale Pyruvatdehydrogenase zu deaktivieren, und kann so die Bildung von Acetyl CoA aus Pyruvat hemmen (Hoshi et al., 1996). Eine Aktivität der mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase wurde im Mittelstück der Spermien nachgewiesen (Gerez de Burgos et al., 1994). Glukose selbst wird ein fördernder Einfluss auf die Kapazitation zugeschrieben (Urner et al., 2001; Williams und Ford, 2001), wobei noch nicht definitiv geklärt werden konnte, ob dieser Mechanismus auf der Bereitstellung von Energie durch die Glykolyse oder durch andere metabolische Produkte beruht. Travis et al. konnten zeigen, dass die metabolischen Wege in Maus-Spermien kompartimentiert sind und dass die Glykolyse in Spermien in der fibrösen Hülle des Flagellums stattfindet (Travis et al., 2001). Sie postulieren dass ATP, welches speziell während der Glykolyse im „Principal piece“ des Flagellums gebildet wird, für die Tyrosinphosphorylierung während der Kapazitation benötigt wird. 1972 konnten Hicks et al. zeigen, dass cAMP zu einer signifikanten Erhöhung des Oxygen-Uptakes in Spermien führte und dass dieser Mechanismus auf einer Konvertierung von Pyruvat in Acetyl CoA beruht. Auch diese Beobachtung würde sich mit einer inaktiven GSK-3 in motilen Spermien decken. Eine Rolle der GSK-3 im Energiemetabolismus motiler Spermien würde weiterhin durch die Befunde von Vijayaraghavan et al. gestützt, die die Lokalisation der GSK-3 in bovinen Spermien in Flagellum und anterior-Region des Kopfes nachweisen konnten. Dass die GSK-3 die Motilität der Spermien beeinflussen kann, zeigt ein sehr aktueller Bericht, dass GSK-3 in der Lage ist, Kinesin zu phosphorylieren. Hierbei phosphoryliert GSK-3 die leichten Ketten des Kinesins und führt so zu einer Inhibition der anterograden, nicht jedoch der retrograden Motilität und zu einer verminderten Bindung des Kinesins an Membranen (Szebenyl et al., 2002). Kinesin ist neben Myosin und Dynein eines der molekularen Motorproteine für ciliare und flagellare Motilität. 1995 zeigten Nojima et al., dass die Protofilamente im Axonem von Seeigel-Spermien nicht nur aus Tubulinen aufgebaut sind. Henson et al. beschrieben 1997, dass Kinesin II im Flagellum von Seeigel- und Sand-Dollar-Spermien lokalisierbar ist. Somit ließen sich die Befunde einer in motilen Spermien inaktiven GSK-3 α mit einem ungestörten Ablauf des Mikrotubuli-Gleitens und damit einhergehender Motilität in Einklang bringen.

Für eine Rolle der GSK-3 während der Gameten-Interaktion spricht die Präsenz der Integrin-Linked Kinase (ILK) in Spermien. Diese Rolle bestünde bei der Vermittlung von Signalkaskaden, die bei der Bindung der beiden Gameten ausgelöst werden. Die ILK wurde erstmals 1996 von Hanningan et al. beschrieben. Sie ist in die Vermittlung von Integrin-, Wachstumsfaktor- und Wnt-Signalwegen involviert. 1993 konnten Glander und Schaller das Vorhandensein von β 1-Integrinen in humanen Spermien nachweisen. Blobel et al. konnten 1992 eine Integrin-Liganden-Domäne auf der Oozyten-Oberfläche nachweisen. Auch die Sequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD), welcher eine Rolle bei der Erkennung von Adhäsionsmolekülen, insbesondere den β 1-Integrinen zugeschrieben wird (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987), inhibiert die Bindung von humanen Spermien an Zona Pellucida-freie Hamster-Oozyten (Bronson und Fusi, 1990). Die Matrix-Proteine der β 1-Integrine Laminin und Fibronectin sind ebenfalls auf der Oberfläche von Spermien nachgewiesen. Das Vorhandensein der Adhäsionsmoleküle auf der Spermienoberfläche lässt aber nicht nur auf eine Funktion bei der Gameten-Interaktion schließen. So postulierten Suarez et al. 1991, dass die Adhäsionsmoleküle auch an der Bindung von Spermien an das Epithel des Oviduktes und damit an der Bildung von Spermien-Reservoirien beteiligt sein könnten. Eine Rolle der Integrin-linked Kinase in humanen Spermien bei der Vermittlung von Signalprozessen, die durch Zell-Zell-Interaktionen induziert werden, ist also durchaus wahrscheinlich. GSK-3 ist ein Zielmolekül der ILK, wobei diese die GSK-3 sowohl durch Aktivierung der PKB, als auch durch direkte Phosphorylierung inaktiviert (Dedhar 2000). Wie oben beschrieben, konnte die PKB in humanen Spermien nicht nachgewiesen werden. Die Inaktivierung der GSK-3 via Serinphosphorylierung durch cAMP war mit dem PKA-Inhibitor H-89 inhibierbar, nicht jedoch die durch Zink induzierte Inaktivierung. Die sich nun stellende Frage ist, ob ILK einen Effekt auf die PKA hat, oder cAMP einen aktivierenden Einfluss auf die ILK ausüben kann. Bisher sind jedoch keine Interaktionen zwischen ILK und PKA oder cAMP beschrieben. Da die Inaktivierung der GSK-3 durch Zink nicht durch den PKA-Inhibitor H-89 inhibierbar war, ist auszuschließen, dass dieser Mechanismus von der PKA vermittelt wird. Es ist also denkbar, dass Zink einen Einfluss auf die Aktivität der ILK hat und in Spermien zwei Signalwege zur Inaktivierung der GSK-3 zur Verfügung stehen: ein durch cAMP und PKA-vermittelter und zum Anderen ein durch Zink und ILK vermittelter Weg. Ob die ILK in Spermien einen Einfluss auf die GSK-3 hat, bedarf aber weiterer Untersuchungen, da in dieser Arbeit keine

Experimente bezüglich des Einflusses der ILK auf GSK-3 durchgeführt wurden. Es ist denkbar, dass GSK-3 durch unterschiedliche Kompartimentierung auch zwei unterschiedliche Funktionen ausüben kann: als Regulator der Motilität im Flagellum und am Spermienkopf als Vermittler der Gameten-Interaktion.

Ein weiteres Enzym, dessen Präsenz in dieser Arbeit in humanen Spermien nachgewiesen werden konnte, ist die PP2A. GSK-3 spielt eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung der Alzheimer Krankheit, da sie in der Lage ist, das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau zu phosphorylieren. Dies führt zur Zerstörung der Mikrotubuli. In vitro-Studien zeigten, dass die Phosphorylierung des Tau-Proteins durch PP2A verhindert werden kann (Gong et al., 1993). Auch eine Interaktion der GSK-3 mit PP2A und β -Catenin in der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) wurde nachgewiesen, welche zur Entwicklung eines Koloekteral-Karzinom führt. Hierbei formt Axin einen Komplex mit dem adenomatous polyposis coli Geneprodukt (APC), der GSK-3 und β -Catenin aus, und führt so zu einer verminderten Expression des β -Catenins. PP2A kann nun direkt an das Axin binden und dephosphoryliert den durch GSK-3 β phosphorylierten APC-Komplex (Ikeda et al., 2000). Das Enzym PP2A besteht aus einer Kern-Einheit aus der katalytischen 36 kDa-Untereinheit und der Scaffolding 65 kDa A-Untereinheit (AC-Core), welche die enzymatischen Eigenheiten moduliert. Unterschiedliche Klassen der B-regulatorischen Untereinheit können an AC binden und so eine große Variabilität an gewebespezifischen, heterotrimeren Komplexen ausbilden. Das AC-Core selber ist in Geweben aktiv, wenn seine Aktivität auch geringer als das des Heterotrimers ist (Turowski et al., 1997). Ein Modell der AC-Core-Aktivität sagt aus, dass das Fehlen spezieller B-Untereinheiten *in vivo* zu einem spezifischen Defekt in den Dephosphorylierungs-Reaktionen führen könnte (Goldberg 1999). Es sind auch Interaktionen der PP2A mit Protein Kinasen beschrieben. So wurde eine Bindung des AC-Cores an Proteinkinase-Untereinheiten gezeigt. Es wurde nachgewiesen, dass das AC-Core *in vitro* an die katalytische Untereinheit von Mitgliedern der sogenannten CMCG-Gruppe von Kinasen binden kann, zu der neben Casein Kinase2 (CK2) auch die MAP-Kinasen, cyclin-dependend Kinasen und die GSK-3 gehören (Chen et al., 1992). In dieser Arbeit konnte ein Vorkommen der B-regulatorischen Untereinheit nur in motilen Spermien nachgewiesen werden, während immotile Spermien eher die A-regulatorische Untereinheit exprimieren.

Nun gibt eine unterschiedliche Verteilung der regulatorischen Untereinheiten allein noch keine Auskunft darüber, ob die PP2A in Spermien überhaupt aktiv ist. In unserer Arbeitsgruppe konnte Enzymaktivität der PP2A in humanen Spermien nachgewiesen werden (unveröffentlichtes Ergebnis). Dass in immotilen Spermien jedoch die A-Untereinheit, in motilen Spermien die B α -Untereinheit nachweisbar war, lässt zwei Interpretationen zu: entweder die PP2A ist nur mit der B α -Untereinheit und damit in motilen Spermien aktiv, oder es liegt durch das Fehlen der B-Untereinheit eine veränderte Substratspezifität vor.

Auch dass B56 α , welche in dieser Arbeit in motilen Spermien nachgewiesen werden konnte, im Cytoplasma von Herz- und Skelettmuskel beschrieben wurde (McCright et al., 1996), lässt sich mit einer Rolle der PP2A und GSK-3 im Energiemetabolismus der Spermien in Einklang bringen. In dieser Arbeit wurde aber der direkte Einfluss von PP2A auf die GSK-3 in Spermien nicht untersucht. Da GSK-3 aber einen Einfluss auf die Aktivität der PP1 in bovinen Spermien ausübt (Smith et al., 1999), ist eine Interaktion mit der PP2A nicht unwahrscheinlich und sollte in weiteren Untersuchungen zu möglichen Zielproteinen der GSK-3 geklärt werden.

Eine Rolle der GSK-3 bei der Ausbildung der dorsal-ventral Achse wäre ebenfalls denkbar (Siegfried et al., 1992). Hierbei spielt die Wnt/ Wg (Wingless)-Signalkaskade eine wichtige Rolle. Die Gene der Wnt-Familie gehören der Frizzled Proteinfamilie an und sind damit glykosylierte Liganden für Membranrezeptoren. Wnt-1 (wingless) wurde zuerst als Protoonkogen identifiziert, welches in Tumoren, die durch das Maus-Mamma-Tumor-Virus induziert wurden, aufreguliert ist. Eine weitere Komponente dieser Signalkaskade ist unter anderem wieder β -Catenin. Dieses erschien als ein mögliches Zielprotein der GSK-3 in Spermien, da bei der Befruchtung der Eizelle eine Zell-Zell-Interaktion eingegangen wird, und N-Cadherin-Transkripte (N-Cadherin ist ein, Adhäsionsprotein, welches mit dem β -Catenin assoziiert), in humanen Spermien beschrieben sind (Goodwin et al., 2000). Des Weiteren wurden, wie oben erwähnt, Interaktionen mit der PP2A beschrieben. Wie die Abbildung 35 zeigt, ist β -Catenin aber nicht per Immunoblot in humanen Spermien nachzuweisen. Mit dem Fehlen dieses Zielproteins zur Ausformung der Dorsoventral-Achse ist es unwahrscheinlich, dass die primäre Rolle der GSK-3 in humanen Spermien in der Ausbildung der Achse nach der Befruchtung der Eizelle liegt. Auszuschließen ist dies jedoch nicht, da β -Catenin als tyrosinphosphoryliertes Protein während der Oocyten-Reifung in der Maus

nachgewiesen wurde (Ohsugi et al., 1999). Um eine mögliche Rolle nach der Befruchtung genauer zu untersuchen, müssen Untersuchungen zum Vorhandensein anderer Komponenten des Wnt-Signalweges in Spermien durchgeführt werden. Bisher sind keine Komponenten dieses Signalweges in Spermien beschrieben, auch wenn es einen Bericht gibt, der aussagt, dass Wnt-1 nicht essentiell für die Spermiogenese ist (Erickson et al., 1993).

4.4 Proteomics

In dieser Arbeit ist es gelungen, das Proteom humaner motiler und immotiler Spermien mit der Methode der 2-dimensionalen Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung darzustellen. Dabei zeigte sich, dass es von Vorteil ist, möglichst kleine pH-Gradienten zu wählen, da die Auflösung der Spots zunimmt (Abb. 38 A, B und C). Die Abbildungen 35 sowie 36 A, B und C zeigen, dass es deutliche Unterschiede in der Proteinexpression zwischen motilen und immotilen Spermien gibt. So scheinen in einigen Molekulargewichtsbereichen manche Proteine in immotilen Spermien weniger exprimiert zu sein als in motilen (Abb. 36 A, 1 und 2, ca. 65 und 45 kDa). Hierbei ist von Bedeutung, dass die Versuche sowohl mit gleichem Proteingehalt als zur Kontrolle auch mit gleicher Anzahl Spermien durchgeführt wurden, um auszuschließen, dass in den immotilen Spermien weniger Gesamtprotein in gleicher Anzahl Spermien exprimiert wird.

Nach 2-dimensionaler Gelelektrophorese konnten zudem Einflüsse durch Inkubation mit 8-Br-cAMP oder Zink auf das Proteinstreifenmuster in motilen Spermien erfaßt werden. Dies betraf Proteine im Bereich von 65kDa (Abb. 39 A, B und C). Das Auftreten neuer Proteinspots ist konsistent mit durch cAMP bzw. Zink induzierten, posttranslationalen Modifikationen. Solche Modifikationen können zudem zu einer besseren Anfärbung der Proteine (Zugang der Silberionen erleichtert) führen. Eines der Spermienproteine wurde per MALDI-TOF-Analyse als Human Serum-Albumin-Precursor identifiziert (Abb. 41(1) und 42). Eine Kontamination mit Rinderserumalbumin (BSA) konnte anhand der identifizierten Peptidsequenz ausgeschlossen werden (Abb. 43). Wie unter 1.4 beschrieben, sind Serumalbumine in der Lage, als Cholesterolakzeptor zu fungieren und leiten damit die Kapazitation ein. Der genaue Mechanismus der Entfernung des Cholesterols aus der Spermienmembran ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Es ist denkbar, dass die Serum-Albumine eine Bindung mit dem noch in der Membran befindlichen

Cholesterol eingehen und in dieser Phase eventuell im Homogenat per 2-dimensionaler Gelelektrophorese nachweisbar sind. Eine Verunreinigung der Homogenate durch sich eventuell im Ejakulat befindliches Serum Albumin ist eher unwahrscheinlich. Denn die Spermien werden vorher einer Reinigung unterzogen, bei sie gleich im ersten Schritt vom Seminalplasma durch Zentrifugation getrennt werden. Sollte das Seminalplasma nur unzureichend von den Spermien getrennt worden sein, wäre es jedoch eher denkbar, dass sich das Albumin in der Bottom-Fraktion anreichert, da die motilen Spermien ja während der sogenannten "Swim-Up"-Prozedur noch weiter aufgereinigt werden. In der Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass genau diese Proteine in den motilen Spermien stärker exprimiert sind. Diese Bande nimmt bei Stimulation mit Zink und 8-Br-cAMP noch deutlich zu. Von BSA ist bekannt, dass es Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen kann. Vielleicht hat Zink einen positiven Einfluss auf die Anlagerung von HSA an die Membran.

Mit dem Keratin Typ I (Abb. 41 (2) und 44) ist es gelungen, ein weiteres Protein zu identifizieren, welches in motilen Spermien stärker exprimiert zu sein scheint als in immotilen (Abb. 36 A). Keratine aus Haut und Haaren stellen eine häufige Verunreinigung in Proben für die 2-dimensionale Gelelektrophorese dar und in manchen Programmen zur Datenauswertung von Massenspektren ist sogar eine Funktion enthalten, die Peptidsequenzen von Keratinen automatisch aus der Identifikation ausschliesst (z.B BioLynx Global Server, Micromass). Die Literaturrecherchen ergaben aber, dass dieses Keratin in Spermien keine Verunreinigung darstellt. So zeigten Calvin et al. bereits 1975, dass die Sequenz der Spermien-Keratine nahezu identisch mit der aus dem Haar ist und dass diese Spermien-Keratine im Flagellum lokalisiert sind. Bhattachayya und Zaneveld beschrieben 1982 keratin-ähnliche Proteine in Spermien verschiedener Spezies. Auch Ochs et al. konnten keratinähnliche Proteine in der akrosomalen Region nachweisen. Von besonderem Interesse ist, dass Zink in einer hohen Konzentration in Keratinen vorhanden ist und für eine normale Keratinogenese benötigt wird (Underwood 1971). 90% des in Spermien vorhandenen Zinks ist im Flagellum lokalisiert. Hierbei bindet Zink an die Disulfidbrücken der Proteine (Calvin 1975b). 1996 erschien ein weiterer Artikel, der mit Sak57 ein weiteres Protein in Spermien beschrieb, welches eine hohe Homologie zu Typ I und II Keratinen aufweist (Tres und Kierszenbaum, 1996). Sak57 ist in Rattenspermatozyten, -Spermatiden und -Spermien mit der Manschette assoziiert, welche aus Tubulinen und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen besteht. Es zeigt sich also, dass die Ausbildung der Keratine und

damit auch die Funktion von Zink mit dem Funktionieren des Flagellums assoziiert ist. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass Zink in er Lage ist, Spermienfunktionen wie Motilität zu regulieren. In diesem Zusammenhang ist es denkbar, dass die Keratine weniger stark in immotilen Spermien darstellen und das eine fehlerhafte Intemediärfilamentstruktur zur Immotilität des Flagellums beitragen könnte.

Als drittes Protein wurde die regulatorische Untereinheit des RNA-Binding Proteins identifiziert (Abb. 36 A in Region 3 und Abb. 41 Spot 3 sowie Abb. 45). Dieses Protein wurde zuerst von Hod et al. beschrieben. Ursprünglich stellt dieses RNA-bindende Protein ein komplexes Protein, bestehend aus RNA-bindenden und regulatorischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 400 kDa dar. Einige dieser Proteine können als RNA-Chaperone agieren und somit zur korrekten Faltung von RNA beitragen (Herschlag, 1995). Auch wurden Motive identifiziert, die zur Protein-Protein-Interaktion beitragen (Biamonti und Riva, 1994). 1993 wurde ein RNA-binding protein beschrieben, welches durch cAMP reguliert wird (Nachaliel et al., 1993). Interessanterweise beschrieben Wagenfeld et al. 1998 ein Homolog des RNA-binding proteins RS, welches sie Contraception Associated Protein1 (CAP1) nannten. Später stellte sich heraus, dass die Proteine CAP1, SP22 und RS identisch sind. Ornidazol-Behandlung induziert innerhalb von 14 Tagen eine Infertilität bei männlichen Ratten, welche aber nicht mit der Abnahme der Motilität der Spermien assoziiert ist. Viel eher beruht der Effekt des Ornidazol-induzierten CAP1 auf einer verminderten Bindungsfähigkeit der Spermien an die Zona Pellucida der Oocyte. Mittels der 2-dimensionalen Gelelektrophorese konnte die Gruppe nachweisen, dass die Behandlung mit Ornidazol zu einer Expression des CAP1 führte. Das Protein konnte per Immunofärbung am Akrosom epididymaler Spermien der Ratte nachgewiesen werden. Es gibt interessanterweise ein humanes Homolog namens DJ-1 mit postulierten onkogenen Eigenschaften, welches in verschiedenen Geweben nachgewiesen wurde (Nagakubo et al., 1997). In dieser Arbeit konnte kein Unterschied in der Expression der regulatorischen Untereinheit des RNA-bindenden Proteins zwischen motilen und immotilen Spermien gefunden werden. Da dieses Protein aber die Fertilität und nicht die Motilität der Spermien reguliert, ist dies auch nicht weiter verwunderlich.

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse lassen auf eine Schlüssel-Rolle des Zinks bei der Regulation von Spermienfunktionen und insbesondere der Motilität schließen. So aktiviert Zink die Adenylatzyklase und führt zu einer Induzierung der Tyrosinphosphorylierung. Beides sind Ereignisse, die ein Marker für die Kapazitation und

die Akrosomen-Reaktion darstellen. Auch ist Zink in der Lage, die Glykogen-Synthase Kinase-3 zu inaktivieren. GSK-3 scheint in immotilen Spermien aktiver als in motilen zu sein, was ebenfalls auf eine Rolle von Zink bei der Regulation von für Motilität und Fertilität wichtige Funktionen hinweist. Es konnte aber gezeigt werden, dass cAMP den inaktivierenden Effekt über die PKA ausübt, während Zink seinen Effekt über einen anderen Mechanismus auszuüben scheint, da eine Inhibition der PKA nicht zu einer verminderten Deaktivierung der GSK-3 durch Zink führt. Auch konnte gezeigt werden, dass Zink-Stimulation einen Einfluss auf das Vorkommen von Human Serum-Albumin Precursor hat, da die Spots deutlich stärker in motilen Spermien, welche mit Zink stimuliert wurden, zu erkennen sind. Auch dass Zink an die für die Struktur und Motilität des Flagellums so wichtigen Intermediärfilamente wie Keratin assoziiert sein kann und Keratine in motilen Spermien stärker exprimiert zu sein scheinen als in immotilen, lässt auf eine positive Rolle des Zinks bei der Motilität schließen.

5. Literatur

Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS (1998) A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation.

J Cell Sci **111**: 645-56

Allison AC, Hartree EF (1970) Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization

J Reprod Fert **21**:509-515

Andrews, J.C, Nolan JP, Hamerstedt RH, Bavister BD (1994) Role of zinc during hamster sperm capacitation

Biol. Reprod, **51**:1238-1247

Ballou LH, Brautigan DL, Fischer EH (1983) Subunit structure and activation of inactive phosphorylase phosphatase.

Biochemistry **22**: 3393-3399

Baltas LG, Karczewski P, Krause EG (1997) Effects of zinc on Phospholamban Phosphorylation

Biochem Biophys Res Comm **232**: 394-397

Bansal P, Atreja SK (1991) Phosphoinositide specific phospholipase C activity of goat spermatozoa in transit from the caput to the cauda epididymis.

Indian J Biochem Biophys **28**: 307-311

Barros C, Bedford JM, Franklin LE, Austin CR (1967) Membrane vesiculation as a feature of the mammal acrosome reaction

J Cell Biol **34**: C1-C5

Baum L, Hansen L, Masliah E, Saitoh T (1996) Glycogen Synthase Kinase 3 alteration in Alzheimer Disease is related to neurofibrillary tangle formation

Mol Chem Neuropathology **29**:253-261

Bedford JM Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis.

In:Hamilton DW: Handbook of Physiology, Section7, Endocrinology Vol5, Male reproductive System American Physiological Society, (Washington DC):303-317

Bjorndahl L, Kjellberg S, Roomans GM, Kvist U (1986) The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation

Int J Androl **9(1)**:77-80S

Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM (1992) a potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion
Nature **356**: 248-252

Bol GF, Gros C, Hulster A, Bosel A, Pfeuffer T (1997) Phorbol ester-induced sensitisation of adenylyl cyclase type II is related to phosphorylation of threonine 1057.
Biochem Biophys Res Commun **237**:251-256

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal Biochem **72**: 248-254.

Braun T (1975) The effect of divalent cations on bovine spermatozoal adenylyl cyclase activity
J Cyclic Nucleotide Res **1**: 271-281.

Brenner, BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML (1990) Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide
Physiol Rev **70**: 665-699

Bronson RA, Fusi E (1990) Evidence that an arg-gly-asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization
Biol Reprod **43**: 1019-1025

Brooks DE (1983) Epididymal functions and their hormonal regulation.
Aust J Biol Sci **36**:205-221

Buck J, Sinclair NL, Schapal L, Cann MJ, Levin LR (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals
Proc Natl Acad Sci USA **96**:79-84

Brooks DE (1987) Androgen-regulated epididymal secretory proteins associated with post-testicular sperm development
In : Orebin-Christ MC, Danzo BJ eds *Cell biology of the testis and epididymis*. *Ann NY Acad Sci* **513**:179-194

Bryan JHD, Unithan RR (1972) Non-specific esterase activity in bovine acrosomes
Histochem J **4**:413-419

Calvin HI, Hwang FA, Wohlrab H (1975) Localization of zinc in a dense fiber-connecting piece fraction of rat sperm tails analogous chemically to hair keratin.

Biol Reprod **13(2)**:228-39

Calvin HI, Bleau G (1974) Zinc-thiol complexes in keratin-like structures of rat spermatozoa.

Exp Cell Res **86(2)**:280-4

Carpino A, Siciliano L, Petroni MF, De Stefano C, Aquila C, Ando S, Petrona MF (1998) Low seminal zinc bound to high molecular weight proteins in asthenozoospermic patients: evidence of increased sperm zinc content in oligoasthenozoospermic patients, *Hum.Reprod.* **13(1)**:111-114

Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB (1996) regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation

Dev Biol **180**:284-296

Chacarov EL, Mollova MV (1976) A one-act differential stain of the acrosome with active dyes

J Reprod Fertil **48**: 245-246

Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV (1989) Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases

Nature (Lond) **341**:68-72

Chen J, Martin BL, Brautigan DL (1992) Regulation of protein serine-threonine phosphatase type 2A by tyrosine phosphorylation

Science **257**: 1261-1264

Chinkers M, Garbers DL (1989) The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling

Science **245**:1392-13294

Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases

Annu Rev Biochem **58**:453-509

Cooper TG (1992) Epididymal proteins and sperm maturation In: Nieschlag E, Habel U-Feds: *Spermatogenesis, fertilization, contraception. Molecular, cellular and endocrine events in male reproduction*. Schering Foundation Workshop 4. Berlin:Springer Verlag, S 285-318

Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B

Nature **378**: 758-789

Cross DAE, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD (2001) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurons from death
J Neurochem **77**: 94-102

Currie MG, Fog KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, Smith CE (1992) Guanylin: An endogenous activator of intestinal guanylate cyclase
Proc Natl Acad Sci USA **89**:947-951

D'Amico M, Hulit J, Amanatullah DF, Zafonte BT, Albanese C, Bouzahzah B, Fu M, Augenlicht LH et al. (2000) The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3 β and cAMP responsive element-binding protein-dependent pathways
J Biol Chem **275**: 32649-32657

Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F (1999) Ion channels in sperm physiology
Phys Rev **79**:481-510

Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, de Vente J, Koesling D, Holstein AF (1996) Nitric oxide/cGMP pathway components in Leydig cells of the human testis
Cell Tiss Res **287**: 161-170

Davis BK, Byrne R, Bedigian K (1980) Studies on the mechanism of capacitation:albumin mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro capacitation of rat sperm cells
*Proc Natl Acad Sci USA***77**:1546-1550

Dedhar S (2000) Cell-substrate interactions and signaling through ILK
Curr Opin Cell Biol **12**: 250-256

Eddy EM, O'Brien DA (1994) The spermatozoon
In:Knobil E, Neill JD Eds *The physiology of reproduction*,second edition. New York:Raven Press:29-77

Eliasson R, Johnson O, Lindholmer C (1971) Effect of zinc on human sperm respiration
Life Sci **10(22)**:1317-1320

Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase.
Eur J Biochem **107**: 519-527

Emiliozzi C, Fenichel P (1997) Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm in vitro but is not sufficient for its completion

Biol Reprod **56**:674-679

Erickson RP, Martin SR (1974) The relationship of mouse spermatozoa to mouse testicular cathepsins
Arch Biochem Biophys **165**: 114-120

Erickson RP, Lai RW, Grimes J (1993) Creating a conditional mutation of Wnt-1 by antisense transgenesis provides evidence that Wnt-1 is not essential for spermatogenesis.
Dev Genet **14**:274-81

Espinosa F, Lopez-Gonzalez I, Munoz-Garay C, Felix R, De la Vega-Beltran JL, Kopf GS (2000) Dual regulation of the T-type Ca²⁺ current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells
FEBS LETT **475**:251-256

Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC jr, Woodgett JR, Mills GB (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A
Proc Natl Acad Sci U S A **97**:11960-5

Feng B, Bhattacharyya A, Yanagimachi R (1988) Ca²⁺ is essential for the motility of plasma membrane-intact, but not demembrated, hamster spermatozoa.
Andologia **20(2)** :155-162

Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment
Nature **313**:310-313

Fisher HM, Brevis IA, Barratt CL, Cook ID, Moore HD (1998) Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation.
Mol Hum Reprod **4**:849-55.

Gadella and Harrison (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in sperm plasma membrane.
Development **127**: 2407-2420

Gauss R, Seifetz R, Kaupp UB (1998) Molecular identification of a hyperpolarisation-activated channel in sea urchin sperm
Nature **393**: 583-587

Gautier-Courteille C, Salanova M, Conti M (1998) The olfactory adenylyl cyclase III is expressed in rat germ cells during spermiogenesis
Endocrinology **139**:2588-2599

Gerez de Burgos NM, Gallina F, Burgos C, Blanco A (1994) Effect of L-malate on pyruvate dehydrogenase activity of spermatozoa
Arch Biochem Biophys **308**: 520-524

Gerzer R, Hofmann F, Schultz G (1981) Purification of a soluble, sodium nitroprussid-stimulated guanylate cyclase from bovine lung
Eur J Biochem **116**:479-486

Glander HJ, Schaller J (1993) Beta-1 integrins of spermatozoa: a flow cytophotometric analysis
Int J Androl **16**: 105-111

Goh P.P, White, I.G. (1988) Control of ram sperm adenylate cyclase by divalent cations
Aust J Biol Sci **41** : 377-385.

Goldberg Y (1999) Protein Phosphatase 2A: Who should regulate the regulator?
Biochem Pharmacol **57**: 321-328

Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain
J Neurochem **62**: 921-927

Gonzales ZW, Meizel S (1973) Acid phosphatases of rabbit spermatozoa II: Partial purification and biochemical characterization of the multiple forms of rabbit spermatozoan acid phosphatase
Biochim Biophys Acta **320**:180-194

Goodwin LO, Karabinus DS, Pergolizzi RG (2000) Presence of N-cadherin transcripts in mature spermatozoa
Mol Hum Reprod **6**: 487-497

Gray JP, Drummond, GI, Luk, DWT, Hardman JG, Sutherland EW (1976) Enzymes of nucleotide metabolism in invertebrate and vertebrate sperm
Arch Biochem Biophys **172**:20-30

Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Garcia R, Thibault G, gutkowska J, Cantin M, Genest J (1984) Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP
Biochem Biophys Res Comm **123**:515-527

Hannigan GE, Leung-Hageseijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Raveda G, Filmus J, Bell JC, Dedhat S (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase

Nature (London) **379**: 91-96

Hardman JG, Sutherland EW (1969) Guanylyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate

J Biol Chem **244**: 6363-6367

Harrison RAP (1988) Preliminary characterization of the multiple forms of rat sperm hyaluronidase

Biochem J **252**:875-882

Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G (1991) Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylate cyclase

FEBS lett **292**:217-222

Harwood A, Plythe SE, woodgett JR, Harwood AJ (1995) Glycogen synthase kinase 3 regulates cell fate in *Dictyostelium*

Cell **80**: 139-148

Haynes LW, Yau KW (1985) Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones.

Nature **317**:64-66

Heukeshoven J, Dernick, R (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels

Electrophoresis **9**: 28-32

Hemmings BA, Resink TJ, Cohen P (1982) Reconstitution of a Mg-ATP-dependent protein phosphatase and its activation through a phosphorylation mechanism

FEBS letters **150**:319-324

Henkel R, Bittner J, Weber R, Hüther F, Miska N (1999) Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility

Fert Ster **71(6)**:1138-1143

Henson JH, Cole DG, Roesner CD, Capuano S, Mendola RJ, Scholey JM (1997) The heterotrimeric motor protein kinesin II localizes to the midpiece and flagellum of sea urchin and sand dollar sperm

Cell Motil Cytoskeleton **38(1)**:29-37

Hershinkel M, Moran A, Grossman N, Sekler I (2001) A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca²⁺ and regulates ion transport

Proc Natl Acad Sci **98**:11749-11754)

Hermo L, Wright J, Oko R, morales CR (1991) Role of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein-2 (Clusterin)

Biol Reprod **44**: 1113-1131

Hicks JJ, Pedron N, Rosado A (1972) Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular fluid

Fertil Steril **23**: 886-893

Hildebrandt JD, Codina J, Tash JS, Kirchick HJ, Lipschultz L, Sekura RD, Birnbaumer L (1985) The membrane-bound spermatozoal adenylyl cyclase system does not share coupling characteristics with somatic cell adenylyl cyclases

Endocrinology **116**: 1357-1366

Hinkovska-Galchev V, Srivastava DN (1992) Phosphatidylcholine and phosphatidylinositol-specific phospholipase C of bull and rabbit spermatozoa

Mole Reprod Dev **33**: 2841-286

Hod Y, Pentyala SN, Whyard TC, El-Maghrabi MR (1999) Identification and characterization of a novel protein that regulates RNA-Protein interaction

J Cell Biochem **72**: 435-444

Hoshi M, Takashima A, Nogushi K, Murayama M, sato M, Kondo S et al. (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain.

Proc Natl Acad Sci U S A **93** : 2719-2723.

Huang DL, Ives HE, Cogan MG (1986) In vivo evidence that cGMP is the second messenger for atrial natriuretic factor

Proc Natl Acad Sci USA **83**:8015-8018

Hurley JH (1999) Structure, mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclase

J Biol Chem **274**:7599-7602

Ikeda S, Kishida M, matsuura Y, Ushi H, Kichuchi A (2000) GSK-3 beta- dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated via beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with axin

Oncogene **19**:537-545

Ishikawa E, Ishikawa S, Davis JW, Sutherland EW (1969) Determination of 3',5'-monophosphate in tissues and of guanylyl cyclase in rat intestine

J Biol Chem **244**:6371-6376

Jiang H, Shabb JB, Corbin JD (1992) Cross-activation: overriding cAMP/cGMP selectivities of protein kinases in tissues

Biochem Cell Biol **70**: 1283-1289

Jones RC (1989) Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis

Oxf Rev Reprod Biol **11**:285-337.

Kandel ES, Hay N (1999) The regulation of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB

Exp Cell Res **253**: 210-229

Katafuchi K, Mori T, Toshimori K, Iida H (2000) Localization of a syntaxin isoform, syntaxin 2, to the acrosomal region of rodent spermatozoa

Mol Reprod Dev **57**:357-383

Kawasaki H, Springett GM; Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1

Science **282**: 2275-2279

Kavanagh JP (1983) Zinc binding properties of human prostatic tissue, prostatic secretion and seminal fluid

J.Reprod.fert. **68** : 359-363

Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals

Humangenetik **26**:231-43

Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F , Hinsch KD, Mülsch A, Böhme E, Schultz G, Frank R (1988) The primary structure of the 70 kDA subunit of bovine soluble guanylate cyclase

FEBS lett **239**:29-34

Kram R, Tompkins GM (1973) Pleiotropic control of cyclic AMP of the stimulation of thymocyte proliferation by cyclic GMP

Proc Natl Acad Sci USA **70**:1659-1663

Kruczynski D, Passia D, Haider SG, Glassmeyer M(1985) Zinc transport through residual bodies in the rat testis; a histochemical study

Andrologia **17(1)**:98-103

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature **227**: 680-685

Lau KF, Miller CCJ, Anderton BH, Shaw PC (1999) Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues

J Peptide Res **54**: 85-91

Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1996) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility

Biol reprod **55**:648-692

Leost M, Schultz C, Link A, Wu YZ, Biernat J, MandelkovEM, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Zaharevitz DW, Gussio R, Senderowicz AM, SausevileEA, Kunick C, Meijer L (2000) Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25

Eur J Biochem **267**: 5983-5994

Levine SN, Steiner AL, Earp HS, Meissner G (1979) Membranous guanylate cyclase of skeletal muscle. Effects of Ca²⁺ and other divalent cations on enzyme activity.

Biochim Biophys Acta **566**:171-182

Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland C (1996) Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma

Anu Repr **11(11)**:2465-2467

Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA (200) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β

Mol Cell Biol **20**: 9356-9363

Lowe DG, Fendly BM (1992) Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase. Hormone cross-linking and antibody reactivity distinguish receptor glycoforms

J Biol Chem **267**:21691-21697

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Par J, Schulz S, Chepnik KP, Waldman SA (2000) Guanylyl cyclases and signalling by cGMP

Pharmacol rev **52**:375-413

Luconi M, Muratori M, Maggi M, Pecchioli P, Peri A, Mancini E, Filimberti E, Forti G and Baldi E (2000) Uteroglobin and transglutaminase modulate human sperm functions

J Androl **21**: 676-688

Luconi M, Marra F, Gandini L, Filimberti E, Lenzi A, Forti G, Baldi E (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition enhances human sperm motility.

Hum Reprod **9**:1931-1937

Lundquist F (1949) Aspects of biochemistry of human semen

Acta Physiol Scand **19**:108

Magnus Ø, Brekke J, Abyholm T, Purvis K (1990) Effects of manganese and other divalent cations on progressive motility of human sperm

Arch Androl **24**:159-166

Majumder GC, Turkington RW (1974) Acrosomal and lysosomal isoenzymes of β -galactosidase and N-Acetyl- β -glucosamidase in rat testis

Biochemistry **13**:2857-2864

Mandal A, Naaby-Hansen S, Wolkowitz MJ, Klotz K, Shetty J, Retief JD, Coonrod SA, Kinter M, Sherman N, Cesar F, Flickinger CJ, Herr JC (1999) FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa

Biol Reprod **61**:1184-1197

Mann T, Lutwak-Mann C, (1981) *Male reproductive function and semen*, Springer Verlag, New York

McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM (1996) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain

J Biol Chem **271**: 22081-22089

Meizel S (1984) The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction

Biol Rev **59**:125-157

Merker HJ, Günther T (1997) Testis Damage induced by zinc deficiency in rats

J Trace Elements Med Biol **11**: 19-22

Murase T, Roldan ER (1995) Epidermal growth factor stimulates hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, generation of diacylglycerol and exocytosis in mouse spermatozoa.

FEBS Lett **360**:242-346

Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Mudalias S, Mohideen T, Carter L, Henry RR (2000) Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes

Diabetes **49**:263

Nojima D, Linck RW, Engelmann EH (1995) At least one of the protofilaments in flagellar microtubules is not composed of tubulin

Curr Biol **5**: 158-167

Norton B, Harriguan-Lum J, Albagli L, Jooss T (1974) The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis by calcium and cyclic nucleotides
Biochem Biophys Res Comm **56**:372-379

Oakely BR, Kirsch DR, Morris NR (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels
Anal Biochem **105**: 361-363

O'Farrel , PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins
J Biol Chem **250**:4007-21

Ohsumi M, Butz S, Kemmler R (1999) Beta-catenin is a major tyrosine-phosphorylated protein during mouse oocyte maturation and preimplantation development.
Dev Dyn **216**: 168-76

Okamura N, Sugita Y (1983) Activation of spermatozoan adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma
J Biol Chem **258**: 13056-13061

Orgebin-Christ MC (1987) Post-testicular development of mammalian spermatozoa.
In: Spera G, de Kretser DM eds *Morphological basis of human reproductive function*. New York:Plenum 155-174

O'Toole CMB, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM (2000) Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction
Mol Biol Cell **11**:1571-1584

Pandy VK, Parmeshwaran M, Soman SD, Dacosa JC (1983) Concentrations of morphologically normal, motile spermatozoa: Mg, Ca, Zn in the semen of infertile men
Sci Total Environ **27(1)**: 49-52

Parker KC, Garrels JI, Hines W, Buttler EM, Mc Kee AH, Patterson D, Martin S (1998) Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination
Electrophoresis **19**:1920-1932

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C, First NL (1994) Differences in the role of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid .
Biol Reprod **51**:1099-1108

Paulus H, Sarker H (1974) Control of transcription in *Bacillus brevis* by small molecules
Basic Life Sci **3**: 21-34

Peters JM, McKay RM, Graff JM (1999) Casein kinase I transduces WNT signals

Nature **401**: 345-350

Peterson RN, Freund M (1968) An evaluation of the respiratory capacity of human spermatozoa

J Reprod Fertil **17**: 357

Pieroni JP, Harry A, Chen J, Jacobowitz O, Magnusson RP, Iyengar R (1995) Distinct characteristics of the basal activities of adenylyl cyclases 2 and 6.

J Biol Chem. **270**:21368-73.

Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, Woodgett JR (1992) Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development *Biochem Biophys Acta* **1114**: 147-162

Potter LR, Garbers DL (1992) Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization

J Biol Chem **267**:14531-14534

Potter LR, Garbers DL (1994) Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation

J Biol Chem **269**:14636-14642

Potter LR, Hunter T (1998) Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor

Mol Cell Biol **18**:2164-2172

Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL (2001) A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa

Proc Natl Acad Sci USA **98**: 12527-12531

Radany EW, Gerzer R, Garbers DL (1983) Purification and Characterization of particulate guanylate cyclase from sea urchin spermatozoa

J Biol Chem **13**: 8346-8351

Ravelli A, Soldati G, Costamagna C, Pellerey O, Aldieri E, Massobrio M, Bosia A, Ghigo D (1999) Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosomal reaction

J Cell Physiol **178**: 85-92

Ravelli A, Costamagna C, Moffa F, Aldieri E, Ochetti SM, Bosia A, Massobrio M, Lindblom B, Ghigo D (2001) Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa.

Biol Reprod **64**:1708-12

Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility
Nature **413**: 603-609

Riffo M, Leiva S, Astudillo J (1992) Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction.
Int. J. Androl. **15**:229-237

Rojas FJ, Bruzzone ME (1992) Regulation of cyclic adenosine monophosphate synthesis in human ejaculated spermatozoa. I. Experimental conditions to quantitate membrane-bound adenylyl cyclase activity
Hum Reprod **7**: 11236-1130

Roselli M, Keller PJ, Dubey RK (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction.
Hum Reprod Update **4**: 3-24

Rothmann JE (1994) Mechanism of intracellular protein transport
Nature **372**:55-62)

Rowley H, Teshima JF; Heller CG (1970) Duration of transit of spermatozoa through the human male ductual system
Fertil Steril **21**: 390-396

Ruoslahti E, Pierschenbacher MD (1987) New perspectives in cell adhesion
Science **238**: 491-497

Ruskoaho H (1992) Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism
Pharmacol Rev **44**:479-602

Ryves WJ, Harwood AJ (2001) Lithium inhibits Glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium
Biochem Biophys Res Commun **280**: 720-725

Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (1998) A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA,**95**:3008-3013.

Schlesinger A, Shelton CA, Maloof JN, Meneghini M, Mowerman B (1999) Wnt Pathway components orient a mitotic spindle in the early *Caenorhabditis elegans* embryo without requiring gene transcription in the responding cell

Genes Dev **13**: 2028-2038

Schulz S, Green CK; Yuen PS, Garbers DL (1990) Guanylyl cyclase is a heat stable enterotoxin receptor
Cell **63**:941-948

Schulz S, Wedel BJ, Mathews A Garbers DL (1998) The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor
J Biol Chem **273**:1032-1037

Schulze W, Rehder U (1984): Organisation and morphogenesis of the human seminiferous epithelium
Cell Tissue Res **237**:395-407

Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R, Virshup DM (1999) Regulation of beta-catenin signaling by B56 subunit of protein phosphatase 2A

Science **283**:2089-2091

Shaw M, Cohen P, Alessi DR (1997) Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase 3- β by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216

FEBS Lett **416**: 307-311

Shuster TA, Martin F, Nagy AK (1996) Zinc causes an apparent increase in rhodopsin phosphorylation
Current Eye Research **15**:1019-1024

Shyjan AW, de Sauvage FJ, Gilett NA, Goeddel DV, Lowe DG (1992) Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase

Neuron **9**:727-737

Si Y, Okuno M (1995) Activation of mammalian sperm motility by regulation of microtubule sliding via cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent phosphorylation

Biol Reprod **53**:1081-1087

Siegfried E, Chou TB, Perrimon N (1992) Wingless signaling acts through zeste-white3, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate

Cell **71**: 1167-1179

Silvestroni L, Modesti A, Sartori C (1992) Insulin-sperm interaction: effects on plasma membrane and binding to acrosome.

Arch Androl **28**:201-11

Singh, Lowe DG, Thorpe DS, Rodriguez H, Kuang WJ, Dungott LJ, Chinkers M Goeddel DW, Garbers DL (1988) Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases
Nature (Lond) **334**:708-712

Smith GD, Wolf DP; Trautman KC, da Cruz e Silva EF, Greengard P, Vijayaraghavan S (1996) Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility
Biol Reprod **54**:719-727

Sørensen MB, Bergdahl IA, HjollundNH, Bonde JP, Stoltenberg M, Ernst E (1999) Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility
Mol Hum Reprod **5(4)**:331-337

Srivastava und Setty (1985) Zinc in the seminal vesicle and cranial and caudal prostate of rhesus monkey (macaca mulatta): Testicular regulation and subcellular distribution
Andrologia **17(6)**:579-582

Stambaugh R, Buckley J (1970) Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus monkey and human sperm
Biol Reprod **3**:275-282

Suarez S, Redfern K, Raynor P, Martin F, Phillips DM (1991) Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: Possible role in formation of a sperm reservoir
Biol Reprod **44**: 998-1004

Sunahara RK, Beuve A, Tesmer JJG, Sprang SR, Garbers DL, Gilman AG (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases.
J Biol Chem **273**:16332-16338

Suzuki N, Shimomura H, Radany EW, Ramarao CS, Ward GE, Bentley JK, Garbers DL (1984) A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa
J Biol Chem **259**:14874-14879

Szebenyl G, Morfini G, Brady ST (2002) Pictures in cell biology. GSK-3 and regulation of kinesin function
Trends Cell Biol **12**:245

Tang WJ, Gilman AG (1995) Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin.
Science **268**:1769-1772

Tang WJ, Stanzel M, Gilman AG (1995) Truncation and alanine-scanning mutants of type I adenylyl cyclase
Biochemistry **35**:14563-14572

Tash JS, Hidaka H, Means AR (1986) Axokinin phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is sufficient for activation of sperm flagellar motility.
J Cell Biol **103**:649-655

Tesmer JJ, Sunahara RK, Johnson RA, Gosselin G, Gilman AG, Sprang SR (1999) Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase
Science **285**: 756-60

Tomes CT, Carballada R, Moses DF, Katz DF, Saling P (1998) Treatment of human spermatozoa with seminal plasma inhibits protein tyrosine phosphorylation
Mol Hum Reprod **4**: 17-25

Travis AJ, Vargas LA, Merdiushev T, Moss SB, Hunnicut GR, Kopf GS (2000) Expression and localisation of calveolin-1 in mouse and guinea pig spermatozoa
Mol Biol Cell **11**:121a

Travis AJ, Jirgez CJ, Merdiushev T, Jones BH, Dess DM, Diaz-Cueto L, Storey BT, Kopf GS, Moss SB (2001) Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa
J Biol Chem **276**: 7630-7636

Troussard AA, Tan C, Yoganathan TN, Dedhar S (1999) Cell-extracellular matrix interactions stimulate AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase3-dependent manner
Mol Cell Biol **19**:7420-7427

Tucker CL, Hurley JH, Miller TR, Hurley JB (1998) Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase.
Proc Natl Acad Sci USA **95**: 5993-5997

Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Holland MK, Orgebin-Christ MC (1993) Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation
Biol Reprod **48**:417-428

Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Araki Y, Orgebin-Christ MC (1995) Purification and characterisation of two forms of β -Galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoproteins

Biochem J **305**:41-50

Turowski P, Favre B, Campbell KS, Lamb NJ, Hemmings BA (1997) Modulation of the enzyme properties of protein phosphatase 2A catalytic subunit by the recombinant 65 kDa regulatory subunit PR65 α

Eur J Biochem **248**: 200-208

Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D (2001) Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose

Biol Reprod **64**: 1350-1357

Vanelli BG, Barni T, Orlando C, Natali A, Serio m, balboni GC (1988) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study.

Fertil Steril **49**: 666-669

Varrone S, Dilauro R, MacchiaV (1973) Stimulation of polypeptide synthesis by cyclic 3',5'-guanosine monophosphate

Arch Biochem Biophys **157**:334-338

Vesely DL, Norris JS, Walters JM, Jespersen RR, Baeyens DA (1987) Atrial natriuretic prohormone peptides 1-30, 31-67 and 79-98 vasodilate the aorta

Biochem Biophys res Commun **148**:1540-1548

Vijayaraghavan S, Liberty GA, Mohan J, Winfrey VP, Olson GE, Carr DW (1999) Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein.

Mol Endocrin **13**:705-717

Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautmann K (1996) Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity

Biol Reprod **54**:709-718

Vijayaraghavan S, Trautman KD, Goueli SA, Carr DW (1997) A tyrosine phosphorylated 55-kilodalton motility-associated bovine sperm protein is regulated by cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and calcium

Biol Reprod **56**: 1450- 1457

Vijayaraghavan S, Mohan J, Gray H, Khatra B, Carr DW (2000) A role for phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α in bovine sperm motility regulation

Biol reprod **62**: 1647-1654

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors S, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995): Capacitation of mouse spermatozoa II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway.

Development **121**:1139-1150

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds Clarke P, Kopf GS (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa I: Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation

Development **121**:1129-1137

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds Clarke P, Kopf GS (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa II: Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway

Development **121**: 1139-1150

Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS (1999) Cholesterol efflux mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation

Dev Biol **214**:429-443

Walensky LD, Snyder SH (1995) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosome of mammalian sperm

J Cell Biol **130**: 857-869

Wallach D, Pastan I (1976) Stimulation of membranous guanylate cyclase by concentration of calcium that are in the physiological range

Biochem Biophys Res Commun **72**:859-865

Weyand I, Godde M, Frings S, Weiner J, Müller F, Altenhofen W, Hatt H, Kaupp UB (1994) Cloning and functional expression of a cyclic nucleotide gated channel from mammalian sperm

Nature **368**: 859-863

Williams AC, Ford WC (2001) The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa

J Androl **22**: 680-695

Yan SZ, Huang ZH, Shaw RS, Tang WJ (1997) Three discrete regions of mammalian adenylyl cyclase form a site for Gs alpha activation.

J Biol Chem **272**:12342-12349

Yanagimachi R (1994) Mammalian fertilization. In:KnobilE, Neill JD (Eds) The physiology of reproduction, Vol2 Raven Press, New York.

Yoshimura M, Cooper DM (1992) Cloning and expression of a Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells.

Proc Natl Acad Sci USA **89**:6716-6720

Zeidel ML, Silva P, Brenner BM, Seifter JL (1987) cGMP mediates effects of atrial peptides on medullary collecting duct cells

Am J Physiol **252**:F551-559

Zhang H, Zheng RL (1996) Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion

Free Radic Res **24**:261-268

Zimmermann G, Zhou D, Taussig R (1998) Mutations uncover a role for two magnesium ions in the catalytic mechanism of adenylyl cyclase.

J Biol Chem **273**: 19650-19655.

6. Abkürzungsverzeichnis/Glossar

6.1 Abkürzungsverzeichnis

8-Br-cAMP	8-Bromo zyklisches Adenosinmonophosphat
AC	Adenylatzyklase
AKAP	A Kinase Anchoring Protein
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
Arg	Arginin
Asn	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	Brain Natriuretic Peptide
Bo	„Bottom-Spermien“, immotil
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Kalzium
cAMP	3'-5'zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	3'-5'zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl	Chlorid
CNG	Cyclic nucleotide gated channel
CNP	C-type natriuretic Peptide
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
DTT	Dithiotriethol
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
ELISA	Enzym-linked immuno sorbant assay
G α	α -Untereinheit eines G-Proteins
GC	Guanylatzyklase
Glu	Glutaminsäure
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wasserstoff
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
H-89	N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide • 2H ₂ O
HCL	Salzsäure
HCO ₃	Bikarbonat
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfat
HRP	Horseraddish Peroxidase
HSA	Human Serum Albumin
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin
IEF	Isoelektrische Fokussierung

ILK	Integrin-Linked Kinase
IP3	Inositol 1,4,5 Triphosphat
K	Kalium
KDa	Kilodalton
Lys	Lysin
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Disorption-Time Of Flight
MEM	Minimal Essential Medium
Mg	Magnesium
Mn	Mangan
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NO	Stickstoffmonoxid
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline solution
PDE	Phosphodiesterase
pI	Isoelektrischer Punkt
PI3K	Phosphoinositol-3 Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
pSer	Phosphoserin
pThr	Phosphothreonin
pTyr	Phosphotyrosin
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rotations per minute
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
Ser	Serin
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNP	Natrium Nitroprussid
SU	„Swim-Up“-Spermien, motil
TBS	Tris buffered saline solution
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
Zn	Zink
ZP	Zona Pellucida

6.2 Glossar

2-dimensionale Gelelektrophorese	Verfahren, bei dem Proteine zuerst ihrer Ladung entsprechend isoelektrisch fokussiert und anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.
Assay	Test/ Untersuchung.
ELISA	Verfahren zur Messung der Enzymaktivität durch Bestimmung der Produktmenge mit Hilfe von Antikörpern.
Kit	Kompletter Satz für eine Methode benötigter Chemikalien und Geräte.
MALDI-TOF	Massenspektrometrische Analyse von (mit Trypsin verdauten) Peptidfragmenten.
Spots	Nach der isoelektrischen Fokussierung und anschließender SDS-PAGE per Proteinfärbung meist kreisförmig sichtbar gemachte Proteine.
Well	Vertiefung in einer Zellkultur/ ELISA-Platte.
Western Blot	Verfahren, bei dem Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen und anschließend mit Antikörpern detektiert werden.

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung durchgeführt und in der Zeit vom 01.04.1998 bis 31.03.01 von der DFG gefördert.

Herrn Dr. Amal Mukhopadhyay gehört mein Dank für das interessante Thema, die intensive Betreuung und seine nie endende Begeisterungsfähigkeit für ein Thema. Auch danke ich für die vielen anregenden Diskussionen und Tipps.

Herrn Dr. Dieter Müller danke ich für zahlreiche Hilfestellungen, Korrekturen und viele Diskussionen, die mich nach geglückten Experimenten schnell wieder den Blick für das Wesentliche finden ließen.

Herrn Dr. Olcese und Herrn Dr. Bretting danke ich für die Übernahme der Gutachten.

Herrn Prof. Leidenberger danke ich für die Unterstützung und das tolle Arbeitsklima am IHF.

Frau Monika Kistler gebührt mein Dank für eine hervorragende Einführung in die Methoden und in die gute Laborpraxis „ihres“ Labors. Ohne die ausführlichen Gespräche über die Dinge außerhalb der (heutigen) wissenschaftlichen Welt und ihren nie endenden wollenden Vorrat an Videokassetten und Knäckebrot wäre ich so manches Mal verzweifelt und verhungert.

Frau Dr. Dorit Arlt möchte ich für ihre Freundschaft und die vielen aufbauenden Worte während unseres gesamten gemeinsamen Studiums danken.

Dem gesamtem Arbeitskreis Mukhopadhyay gehört mein Dank für das hervorragende Arbeitsklima, ständige Diskussions- /Hilfsbereitschaft und viele aufbauende Worte. Hierbei seien besonders Dr. Bärbel Brunswick-Spickenheier, Dr. Hajo Paust, Dr. Lygia Budnik, und Dr. Ravinderjit Anand genannt.

Allen Doktoranden des Institutes sei an dieser Stelle für ihr Mitfühlen und der Bereitschaft, Wissen über gute Methoden weiterzugeben, gedankt.

Frau Petra Derr danke ich für die Hilfestellung bei der Etablierung der Proteomics-Methode an unserem Institut (es ist immer gut, wenn der Informationsfluss zwischen den Arbeitsgruppen gewährleistet wird).

Frau Küster aus dem Labor Dr. Hektor der endokrinologischen Gemeinschaftspraxis möchte ich für ihre Kooperationsbereitschaft und Geduld danken.

Den „lieben männlichen Mitarbeitern“ des Institutes danke ich für ihre Kooperationsbereitschaft.

Meiner Familie, insbesondere aber meinen Eltern (und Schwiegereltern) danke ich für den nicht zu zerstörenden Glauben an meine Fähigkeiten und immerwährende Unterstützung.

Der größte Dank gehört aber meinen Mann Mark, der von Beginn des Studiums bis zum Abschluß der Promotion nie aufgehört hat, an mich zu glauben und mich in allen Belangen zu unterstützen. Auch wurde seine Geduld während der vier Jahre Promotion, ganz besonders aber in der Schlußphase, auf die Probe gestellt; Verloren hat er sie aber nie. Dafür, dass er meine Launen immer ertragen hat, danke ich ihm ganz besonders.

DANKE

Lebenslauf

Name : Birthe Willipinski-Stapelfeldt, geb. Willipinski

Anschrift: Bei der Apostelkirche 26
20257 Hamburg

Geburtsdatum: 12.04.1971

Geburtsort: Bad Segeberg, Schleswig Holstein

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 1976-1990 Gesamtschule Horn, Hamburg
Abschluß: Abitur

Studium: WS 1990- SS 1991 Studium der Biochemie an der
Universität Hannover
WS 1991-1998 Studium der Biologie an der Universität
Hamburg. Abschluss Diplom in den Nebenfächern Genetik
und Zoologie sowie im Hauptfach Biochemie. Anfertigung der
Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie
der Universität Hamburg unter der Leitung von Prof. G.
Gercken mit dem Thema „Streßinduzierte
Proteinphosphorylierung in isolierten, kultivierten
Kardiomyocyten“.

Seit April 1998 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität
Hamburg und Anfertigung der Promotion mit dem Thema
„Untersuchungen zu Signaltransduktionsmechanismen in
humanen Spermien“.