

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.