

Aus dem Institut für Anatomie III des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Z. Halata

cGMP-abhängige Signalwege in Spermatozoen des Rindes

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Oliver Borchert
aus Hamburg

Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 18. Februar 2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Middendorff

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. G. Mayr

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M.S. Davidoff

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN.....	5
FRAGESTELLUNG.....	6
I. EINFÜHRUNG.....	7
I.1. Grundlagen cGMP-abhängiger Signaltransduktion.....	7
Die Guanylatcyclasen.....	8
Die cGMP-bindenden Proteine.....	10
Proteinkinasen	10
Ionenkanäle.....	10
Phosphodiesterasen.....	11
I.2. cGMP-abhängige Signaltransduktion in Spermatozoen.....	12
I.3. Das retinale cGMP-System.....	15
II. MATERIAL UND METHODEN.....	17
II.1. Isolierung von Spermatozoen aus Rindernebenhoden.....	17
II.2. Proteinpräparation aus Geweben.....	18
II.3. Western Blot.....	19
II.4. Nicht-radioaktive Bindungsstudien mit 8-Fluorescein gekoppeltem cGMP bzw. cAMP.....	22
II.5. Immunpräzipitation/Proteinisolierung.....	24
II.6. Immunhistochemie (konventionell).....	26
II.7. Immunzytochemie (Fluoreszenz).....	28
II.8. cGMP-ELISA.....	30
II.9. Beurteilung der Spermienmotilität.....	32
II.10. Liste und Beschreibung der verwendeten Primärantikörper, Proteine und Peptide.....	33
II.11. Liste der verwendeten Chemikalien.....	36
III. ERGEBNISSE.....	38
III.1 lösliche Guanylatcyclase (sGC).....	38
III.1.1 Western-Blot Untersuchungen.....	38

III.1.2. Immunzytochemie.....	39
III.1.3. Nachweis NO-abhängiger cGMP-Akkumulation.....	40
III.1.3.a) ELISA-Untersuchungen.....	40
III.1.3.b) cGMP-Immunzytochemie.....	44
III.1.4. Beurteilung der Spermienmotilität.....	45
III.2. cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I).....	46
III.2.1 Western-Blot Untersuchungen.....	46
III.2.2 Immunzytochemie.....	47
III.2.3 nicht-radioaktive cGMP-Bindungsstudien.....	48
III.3. Guanylatcyclase aktivierendes Protein 1 (GCAP-1).....	50
III.3.A. Untersuchungen mit dem monoklonalen GCAP-1 Antikörper.....	50
III.3.A.1. Immunhistochemie.....	50
III.3.A.2. Western-Blot Untersuchungen.....	53
III.3.A.3 Isolierung des Proteins.....	55
III.3.B. Untersuchungen mit dem polyklonalen GCAP-1 Antikörper.....	57
III.3.B.1. Vergleich der beiden GCAP-Antikörper.....	57
III.3.B.2. Ergebnisse an Spermien.....	59
IV. DISKUSSION.....	61
IV.1. die sGC.....	61
IV.2. die PKG I.....	64
IV.3. Die Untersuchungen zu Komponenten des retinalen cGMP-Weges.....	68
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	72
VI. LITERATURVERZEICHNIS.....	73
VII. DANKSAGUNG.....	83
LEBENS LAUF.....	84
ERKLÄRUNG.....	85

ABKÜRZUNGEN

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklischen Guanosinmonoposphat
CNG-Kanal	zyklisch-Nukleotid gesteuerter Ionenkanal
GCAP	Guanylatcyclase aktivierendes Protein
IBMX	Isobuthylmethylxanthin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxain-1-one
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase (Syn. GK, cGK)
retGC	retinale Guanylatcyclase
sGC	lösliche Guanyatcyclase
SNP	Nitroprussid-Natrium

FRAGESTELLUNG

Während das Vorkommen und die Bedeutung einer Reihe von Signalsystemen in Säugetierspermatozoen gut untersucht ist, wird die Relevanz des Botenstoffes zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), dessen herausragende Bedeutung für die Chemotaxis der Spermatozoen mariner Invertebraten unstrittig ist, für die Biologie von Spermatozoen der Mammalier bislang kontrovers diskutiert. Die in der Literatur hierzu zu findenden Berichte basieren zumeist auf Beobachtungen funktioneller Untersuchungen und liefern insgesamt ein bruchstückhaftes Bild.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen und die Bedeutung cGMP-abhängiger Signalwege in Spermatozoen von Mammaliern am Beispiel des Rindes *Bos taurus* zu untersuchen. Hierzu sollte die Expression, die subzelluläre Lokalisation sowie die in vivo-Funktionalität von einigen Schlüsselkomponenten dieses Systems untersucht werden.

Neben den in einer Vielzahl von Zelltypen beschriebenen Enzymen lösliche Guanylatcyclase (sGC) und cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) sollten hierbei auch Komponenten des aus der Retina bekannten cGMP-Systems berücksichtigt werden, von dem mit einem zyklisch Nukleotid gesteuerten Ionenkanal (CNG-Kanal) bereits ein wesentliches Element in Rinderspermatozoen nachgewiesen werden konnte.

I. EINFÜHRUNG

I.1. Grundlagen cGMP-abhängiger Signaltransduktion

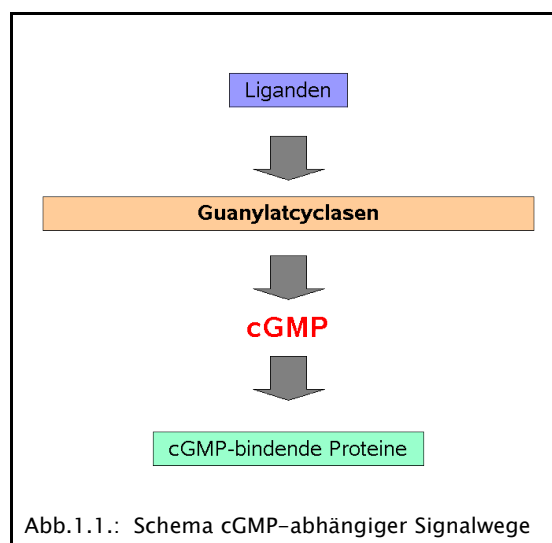
Einführend sollen die grundlegenden Prinzipien cGMP-abhängiger Signaltransduktion kurz vorgestellt werden (Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Lucas et al. 2000).

Bei dem intrazellulären Botenstoff zyklisches Guanosin-Monophosphat, kurz cGMP, handelt es sich um einen so genannten „second messenger“, also einen „zweiten Boten“, der durch eine Reihe verschiedener Guanylatcyclasen unter Abspaltung eines Pyrophosphates aus Guanosintriphosphat (GTP) gebildet wird:



Die meisten cGMP-bildenden Enzyme können als Rezeptoren im klassischen Sinne aufgefasst werden, da ihre Aktivität zumeist durch die Bindung jeweils spezifischer Liganden wie etwa der natriuretischen Peptide beeinflusst wird.

Der weitere Signalweg verläuft über verschiedene cGMP-bindende Proteine, die ihrerseits wieder in unterschiedlicher Weise das zelluläre Geschehen beeinflussen. Es lässt sich das in Abb.1.1. skizzierte grobe Schema darstellen.



Im Folgenden sollen nun kurz die wichtigsten Komponenten des cGMP-abhängigen Signalsystems vorgestellt werden.

Die Guanylatcyclasen

Die Guanylatcyclasen (siehe hierzu auch Wedel et al. 2001) werden im Allgemeinen aufgrund ihrer unterschiedlichen zellulären Lokalisation in membrangebundene und lösliche Guanylatcyclasen eingeteilt.

- Die Enzyme der ersten Gruppe, also der membrangebundenen Guanylatcyclasen, bilden Homodimere aus zwei Untereinheiten, die die Zellmembran durchspannen. Der prinzipielle Aufbau ist allen membrangebundenen Guanylatcyclasen gemeinsam:
Einer N-terminalen extrazellulär gelegenen Liganden bindenden Domäne folgt eine einzelne transmembranöse Region, intrazellulär liegt eine sog. Kinase-Homologie-Domäne, die eine Rolle bei der Aktivierung zu spielen scheint. Am C-Terminus befindet sich die hochkonservierte Guanylatcyclase-Domäne (Tremblay et al. 2002).
Bisher konnten nicht für alle Guanylatcyclasen dieser Gruppe spezifische Liganden identifiziert werden. Bei den bisher bekannten handelt es sich jedoch zumeist um Peptidhormone.
Zu der Gruppe der membrangebundenen Guanylatcyclasen zählt u.a. auch der Rezeptor für das in den Herzvorhöfen gebildete Atriale Natriuretische Peptid ANP sowie die retinalen Guanylatcyclasen retGC 1 und 2 bzw. GC-E und -F. Diese beiden retinalen Enzyme zeigen einen anderen Aktivierungsmechanismus: Sie werden vermittels eines Guanylatcyclase-aktivierenden Proteins (GCAP) durch den intrazellulären Kalziumspiegel in ihrer Aktivität reguliert, während extrazelluläre Liganden bisher nicht beschrieben worden sind (eine Übersicht hierzu findet sich in Dizhoor et al. 1999).

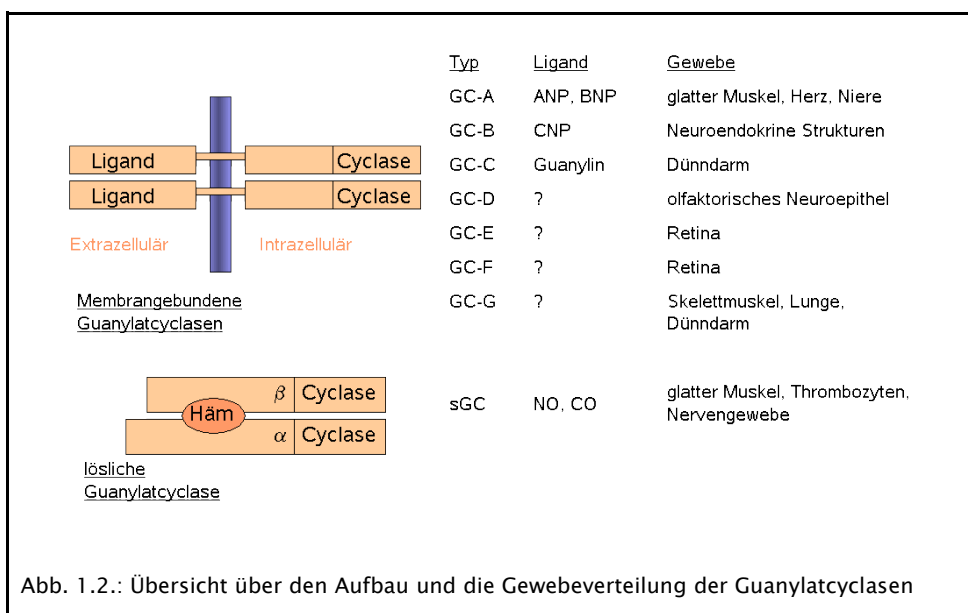
- Die Enzyme der zweiten Gruppe, also die löslichen Guanylatcyclasen, zeigen einen anderen Aufbau:

Es handelt sich hierbei um intrazellulär gelegene Heterodimere, die zwischen den Untereinheiten ein Häm-Molekül als prosthetische Gruppe gebunden haben. Durch die Bindung von Stickstoffmonoxid (NO), gebildet von NO-Synthasen (NOS), oder Kohlenstoffmonoxid (CO) an das Eisenion der Häm-Gruppe kommt es zur Aktivierung der löslichen Guanylatcyclasen (Friebe et Koesling 2003).

Bisher sind sechs verschiedene Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ identifiziert worden (Lucas et al. 2000), wobei bislang in vivo nur die Heterodimere $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ beschrieben worden sind.

Die $\alpha 1\beta 1$ Isoform wird in einer großen Anzahl von Zelltypen und Geweben exprimiert, so wird über dieses Enzym etwa die NO-abhängige Relaxation glatter Muskelzellen oder die Hemmung der Blutplättchenaggregation vermittelt. Die $\alpha 2\beta 1$ Isoform ist bisher u.a. in der menschlichen Plazenta sowie an synaptischen Membranen beschrieben worden.

Eine Übersicht über den Aufbau und einige typische Gewebelokalisationen der beschriebenen Guanylatcyclasen gibt das folgende Schema (Abb. 1.2.):



Die cGMP-bindenden Proteine

Es sind im Wesentlichen drei Arten von Effektormolekülen beschrieben, die die Wirkungen des second messengers cGMP vermitteln:

- **Proteinkinasen**

Proteinkinasen, die spezifisch durch die Bindung von cGMP aktiviert werden, werden als cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) (Synonym: G-Kinasen, GK, cGK) bezeichnet. Es sind zwei verschiedene Formen bekannt: die in glatter Muskulatur, Thrombozyten und einer Reihe weiterer Zelltypen anzutreffende PKG I (Molekulargewicht 76kD) mit den beiden Isoformen PKG I α und β , die durch alternatives Splicing am N-terminalen Ende entstehen (Wernet et al. 1989), und die vor allem in Gehirn, Niere und Dünndarm beschriebene membrangebundene PKG II (Molekulargewicht 86kD) (Vaandrager et al. 2003).

Zu den Zielmolekülen, die durch die PKG I phosphoryliert werden, zählen unter anderem der IP₃-Rezeptor, das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein VASP, Vimentin sowie eine Reihe von Kanalproteinen (Carvajal et al. 2000). Von der PKG II ist unter anderem eine Phosphorylierung des CFTR-Cl⁻ Kanals, dessen Rolle in der Ätiologie der zystischen Fibrose gut bekannt ist, beschrieben worden (Hofmann et al. 2000).

- **Ionenkanäle**

Diese als zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle) bezeichneten Proteine sind in einer Vielzahl von Zelltypen zu finden und kommen in einer Reihe verschiedener Typen und Untergruppen vor. Die Kanalproteine sind durch sechs membranspannende Segmente sowie eine zyklisch-Nukleotid bindende Domäne gekennzeichnet, die homolog zu der in den cGMP-abhängigen Proteinkinasen vorhandenen ist.

Die meisten Kanäle dieser Familie bilden aus zwei verschiedenen Untereinheiten α und β zusammengesetzte Heterotetramere, die direkt durch zyklische Nukleotide geöffnet werden

und den Einstrom von Natrium- und Kalziumionen in die Zelle regulieren (Kaupp et Seifert 2002). Prinzipiell sind alle diese Kanäle sowohl durch cAMP als auch durch cGMP aktivierbar, jedoch mit unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber den beiden zyklischen Nukleotiden.

- **Phosphodiesterasen**

Bislang sind über zehn verschiedene Familien dieser zyklische Nukleotide spaltenden Enzyme beschrieben worden. Die verschiedenen Enzyme bauen cAMP und cGMP mit unterschiedlicher Spezifität ab und werden durch eine Reihe von Mechanismen aktiviert oder gehemmt, unter anderem auch über die zyklischen Nukleotide selbst (Matsumoto et al. 2003). Somit können diese Proteine auf verschiedene Weise Einfluss auf die cGMP-Signaltransduktion nehmen, da sie einerseits zum Teil cGMP abbauen und andererseits zum Teil in ihrer Funktion durch cGMP beeinflusst werden können. Über cGMP-beeinflusste cAMP-abbauende PDEs bzw. cAMP-beeinflusste cGMP-spaltende PDEs ist eine Wechselwirkung zwischen den Signalwegen der beiden bekannten zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP möglich (ein Beispiel für eine solche Wechselwirkung findet sich in Lugnier et a. 1999).

In einem etwas differenzierteren Schema lässt sich die cGMP-Signaltransduktion nun wie folgt darstellen (Abb. 1.3.):

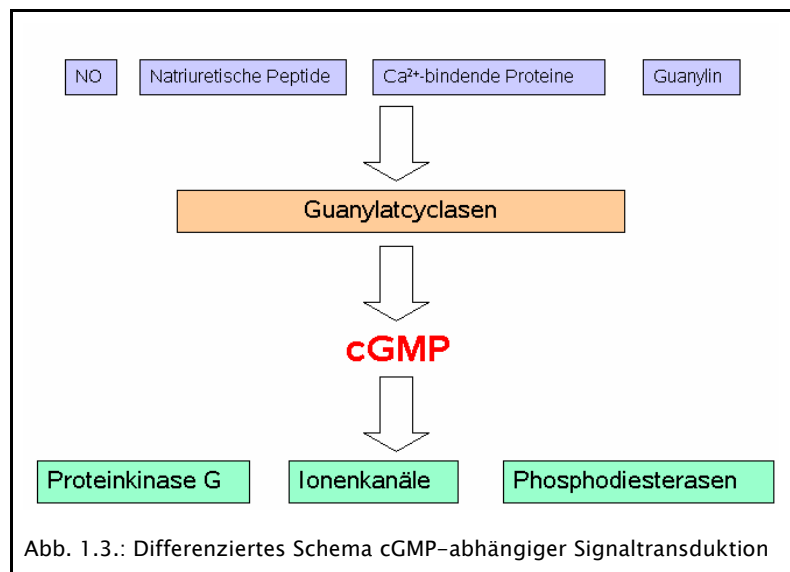


Abb. 1.3.: Differenziertes Schema cGMP-abhängiger Signaltransduktion

1.2. cGMP-abhängige Signaltransduktion in Spermatozoen

In der Biologie der Spermatozoen mariner Invertebraten wie denen des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* ist die große Bedeutung cGMP-abhängiger Signalwege gut bekannt. Hier führen die chemotaktischen Peptide Speract und Resact (Eisenbach 1999) zu einer Aktivierung membrangebundener Guanylatcyclasen, gefolgt von der Öffnung cGMP-gesteuerter Ionenkanäle (Cook et al. 1994, Galindo et al. 2000, Kaupp et al. 2003). Durch den resultierenden Ionenstrom kommt es zu einer Beeinflussung der Spermienmotilität.

Ferner konnte die Produktion des kurzlebigen Aktivators NO der löslichen Guanylatcyclase sGC durch NO-Synthasen (NOS) in Seeigelspermatozoen nachgewiesen werden. NO hat sich als notwendig für die Aktivierung der Eizelle bei der Befruchtung erwiesen (Kuo 2000).

Für Säugetiere ist die Rolle des cGMP in der Biologie der Spermatozoen bislang weit weniger geklärt. Eine Reihe von Untersuchungen beschäftigt sich zwar mit diesem Thema (Revelli et al. 2002 und Herrero 2003), jedoch konnten bisher mit wenigen Ausnahmen nur indirekte Nachweise für das Vorkommen von Komponenten cGMP-abhängiger Signalweges erbracht werden.

So wurde gezeigt, dass es nach Applikation von cGMP-Analoga zu einem Ca^{2+} -Einstrom in Spermatozoen des Rindes (Wiesner et al. 1998) und der Maus (Kobori et al. 2000) kommt. In Rinderspermatozoen konnte ein cGMP-gesteuerter Ionenkanal (CNG-Kanal) in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden, dessen Rolle in den Sinneszellen der Netzhaut sehr gut untersucht ist (Wiesner et al. 1998). Des weiteren ist kürzlich bei der Maus und beim Menschen eine neue, Spermien-spezifische und für die Fertilität bedeutende Kanalproteinfamilie –die sog. CatSper Familie– beschrieben worden und es wurde gezeigt, dass diese Ionenkanäle in ihrer Funktion durch cAMP und alternativ auch durch cGMP beeinflusst werden können (Quill et al. 2001, Ren et al. 2001, Carlson et al. 2003, Quill et al. 2003).

Für das in den meisten somatischen Zellen bedeutendste cGMP-Effektorprotein, die cGMP-abhängige Proteinkinase PKG (Carvajal et al. 2000), fehlen zur Zeit derart gut belegte Nachweise. Das Vorkommen der PKG in männlichen Keimzellen von Mammaliern erscheint jedoch durch den Nachweis eines spezifischen Ankerproteins für diese Proteinkinase in testikulären Keimzellen der Ratte (Yuasa et al. 2000) wahrscheinlich. Durch funktionelle Untersuchungen mit PKG-Inhibitoren wurde ein Signalweg postuliert, der über die PKG-Aktivierung zur Akrosomreaktion führen soll (Revelli et al. 2001).

Ebenso wenig existierten bisher gut abgesicherte Daten für das Vorkommen der cGMP-produzierenden Guanylatcyclasen in Säugetierspermatozoen. Funktionelle Untersuchungen liefern jedoch einige Hinweise auf die Aktivität der membrangebundenen GC-A sowie der sGC. So wurde von einem durch den GC-A Aktivator atriales natriuretisches Peptid (ANP) hervorgerufenen cGMP-Anstieg in Rinderspermien berichtet und eine Verbindung zur Akrosomreaktion sowie zu chemotaktischen Prozessen hergestellt (Anderson et al. 1994, Zamir et al. 1995, Eisenbach 1999). In den Tubuli seminiferi des Rattenhodens wurden zudem vor kurzem außerordentlich hohe Konzentrationen der GC-A nachgewiesen (Müller et al. 2004).

Die bisherigen Untersuchungen über Effekte des sGC-Aktivators NO auf Spermatozoen von Mammaliern (eine Übersicht über diese Untersuchungen findet sich in Revelli et al. 2002 sowie in Herrero et al. 2003) beschäftigen sich mit Auswirkungen auf die Kapazitation (Sengoku et al. 1998, Herrero et al. 1999), die Akrosomreaktion (Revelli et al. 2001, Joo et al. 1999) und die Motilität (Sengoku et al. 1998, Joo et al. 1999, Lewis et al. 1996, Zhang et al. 1996, Yeoman et al. 1998). Hierbei wurden stimulierende Effekte von niedrigen Konzentrationen des NO-Donors Natriumnitroprussid (SNP) auf die Motilität von Spermien des Menschen (Lewis et al. 1996, Zhang et al. 1996) und des Hamsters (Yeoman 1998) beschrieben. Höhere Konzentrationen hingegen führten bei Spermatozoen von einer Reihe von Spezies zu einer Herabsetzung der Motilität (Sengoku et al. 1998, Herrero et al. 1999, Zhang et al. 1996). Zusätzlich gibt es mehrere Berichte über das Vorkommen NO-

1.2. cGMP-abhängige Signaltransduktion in Spermatozoen

produzierender Enzyme (NOS) in Spermatozoen von Säugetieren (eine Übersicht findet sich in Davidoff et Middendorff 2000).

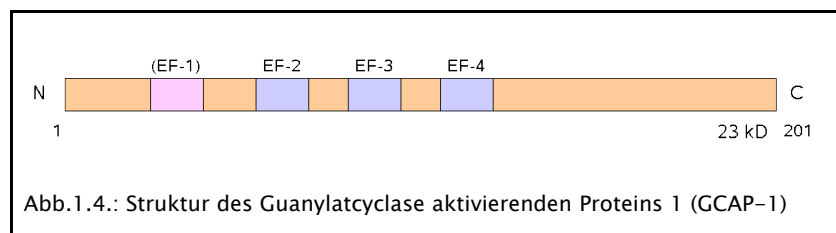
Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Vorkommen cGMP-abhängiger Signalwege in Spermatozoen des Rindes und anderer Mammalier zwar durch die Beobachtung von verschiedenen Effekten von Guanylatcyclase aktivierenden Substanzen sowie die Beschreibung einzelner cGMP-Effektormoleküle wahrscheinlich erscheint, jedoch der direkte Nachweis einer Guanylatcyclase als Quelle des intrazellulären cGMP bisher aussteht.

1.3. Das retinale cGMP-System

Wie oben ausgeführt, ist in Spermatozoen des Rindes mit dem cGMP-gesteuerten Ionenkanal (CNG-Kanal) eine cGMP-Signalwegskomponente gut charakterisiert worden (Wiesner et al. 1998), deren Vorkommen auch in den retinalen Sinneszellen, den Stäbchen und Zapfen, beschrieben ist. In diesen Zellen ist die Regulation der Kanalfunktion durch eine Reihe als Retina-spezifisch beschriebener Proteine gut untersucht (Kaupp 1994).

In den Stäbchen und Zapfen der Retina wird das cGMP durch eine als retinale Guanylatcyclase (retGC, zwei bekannte Isoformen 1 und 2) bezeichnete membrangebundene Guanylatcyclase produziert (Koch et al. 1994). Den wesentlichen Effektor stellt der oben genannte CNG-Kanal dar, durch den im geöffneten Zustand Kationen, insbesondere Kalzium, in die Zelle einströmen.

Eine negative Rückkopplung erfährt das System durch die wahrscheinlich konstitutiv an die retGC bindenden Guanylatcyclase aktivierenden Proteine GCAP-1, GCAP-2 und GCAP-3 (Schrem et al. 1999, Kachi et al. 1999, Haeseleer et al. 1999). Bei diesen Proteinen handelt es sich um kalziumbindende Proteine aus der Calmodulin-Superfamilie. Das GCAP-1 erwirkt bei erhöhten Kalziumspiegeln eine Inhibition der cGMP-Produktion durch die retGC (Dizhoor et al.



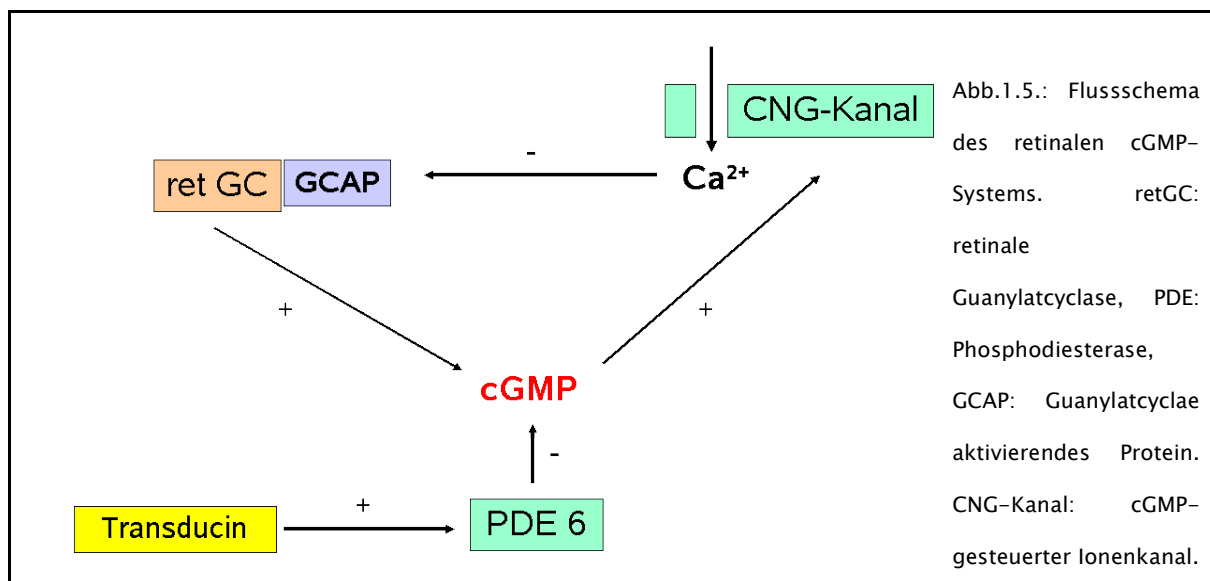
1999), die Kalziumbindung erfolgt über drei funktionell aktive EF-Hand Domänen (Ikura 1996) (Abb.1.4.).

Die Änderung des Membranpotentials der retinalen Sinneszellen bei Lichteinfall wird über den folgenden Mechanismus ausgelöst:

Vermittelt über eine Signalkaskade, an deren Anfang die Absorption eines Lichtquanten an das Sehpigment Rhodopsin steht (Kaupp 1994), kommt es zur Aktivierung des G-Proteins

Transducin. Daraufhin kommt es zur Freilegung der katalytischen Untereinheiten einer Retina-spezifischen Phosphodiesterase (PDE6) und somit zum Abbau intrazellulären cGMPs. Durch den nun erniedrigten cGMP-Spiegel sinkt auch die Offen-Wahrscheinlichkeit der CNG-Kanäle, der Kationeneinstrom nimmt ab, es kommt zur Hyperpolarisation der Zelle.

Die Wechselwirkungen der einzelnen Signalkomponenten sind schematisch in Abb. 1.5. dargestellt:



Da das GCAP die retGC in Abhängigkeit des Kalziumspiegels hemmt, führt der bei Lichteinfall abgesunkene Kalziumspiegel zu einer gesteigerten cGMP-Produktion, die der Zelle eine rasche Rückkehr in den depolarisierten Zustand nach Beendigung des Lichteinfalls ermöglicht.

Um die Rolle des beschriebenen CNG-Kanals in den Spermatozoen besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit auch Untersuchungen zum Vorkommen anderer „retinaler“ cGMP-Signalwegskomponenten durchgeführt.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1. Isolierung von Spermatozoen aus Rindernebenhoden

Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS)
- Lockes Salzlösung (LSS): 154mM NaCl; 5,6mM KCl; 2,2mM CaCl₂; 1mM MgCl₂; 6mM NaHCO₃; 10mM Glucose; 2mM HEPES in Aqua dest.

Durchführung:

Die verwendeten Rindernebenhoden stammten aus einem Hamburger Schlachthof, die Nebenhoden wurden bis zur Verwendung in HBSS auf Eis bzw. bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Isolierung der Spermien erfolgte direkt vor ihrer Verwendung. Im Allgemeinen wurden die Versuche am selben Tag durchgeführt, ausnahmsweise fand eine Lagerung der Nebenhoden über Nacht statt.

Mit einem Skalpell wurden die Nebenhodenkanälchen angeschnitten und die austretenden Spermien in LSS suspendiert. Für die Stimulationsversuche wurden die Spermien anschließend bei 36°C im Brutschrank verwahrt.

II.2. Proteinpräparation aus Geweben

Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Homogenisierungspuffer: 25mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7,2; 5mM EGTA; 0,1mM DTT; 1,0mM PMSF
- BCA-Kit (Pierce, Rockford, IL; 23225)

Durchführung:

Das in flüssigem Stickstoff tiefgekühlte Gewebe wurde zuerst mechanisch in kleinere Stücke zerschlagen und anschließend in einem Mikro-Dismembrator (Mikro-Dismembrator U, B.Braun) bei 1200rpm eine Minute lang pulverisiert. Das Pulver wurde zusammen mit einer entsprechenden Menge Homogenisierungspuffer in einen Glashomogenisator (B.Braun, 853202) überführt und dort homogenisiert. Während des gesamten Vorgangs wurde auf eine sorgfältige Kühlung geachtet.

Die so hergestellte Suspension wurde für 8 Minuten bei 3000g (4°C) zentrifugiert, um Kerne und Zelltrümmer zu entfernen. Bei einem Teil der Proben folgte eine Ultrazentrifugation des Überstandes für 30 Minuten bei 100000g, um die lösliche und die Membranfraktion zu erhalten.

Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde nach der Bichinonsäure-Methode nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung eines Photometers (Ultraspec 3000, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestimmt.

II.3. Western Blot

Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- 30% Acrylamid/Bis (37,5:1)
- 4x Trenngelpuffer: 1,5M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS
- 4x Sammelgelpuffer: 0,5M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS
- 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- TEMED
- 8% Gel: 5ml 4x Trenngelpuffer; 5,4ml 30% Acrylamid / Bis; 9,7ml Aqua dest; 100µl APS; 20µl TEMED
- 12% Gel: 5ml 4x Trenngelpuffer; 8ml 30% Acrylamid / Bis; 7ml Aqua dest; 100µl APS; 20µl TEMED
- Sammelgel: Für zwei Gele: 2,5 ml 4x Sammelgelpuffer; 1,4 ml 30% Acrylamid / Bis; 6,2 ml Aqua dest.; 50µl APS; 12,5µl TEMED
- 3x Stopp-Mix: 0,375M Tris-HCl pH 6,8; 0,2M DTT; 15% SDS; 20% Glycerin; 0,6mg/dl Bromphenolblau
- Standard-Marker (Gibco BRL 10748-010)
- PAGE-Puffer: 25mM Tris-HCl pH 8,4; 193mM Glycin; 0,1% SDS
- Transferpuffer: 100mM Tris; 193 mM Glycin
- 0,2% Ponceau-Rot
- TBS-T: 20mM Tris; 137mM NaCl; 0,05% Tween 20
- Blotmembranen: PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia); Nitrozellulose (Protran®, Schleicher&Schuell, 10401196)
- Blottingpapier (Schleicher&Schuell 426890)
- Blockierungslösungen: 5% Magermilchpulver in TBST, oder (z.T. für Nitrozellulose-Membranen verwendet): Roche blocking reagent 1096176
- Antikörper-Inkubationspuffer: 10% der verwendeten Blockierungslösung in TBS-T;

0,005% Thimerosal

- Primärantikörper: siehe II.10.
- Sekundärantikörper
 - Bei monoklonalem Primärantikörper:
 - Ziege anti-Maus IgG-Peroxidase 1:2000 (Pierce, Rockford, IL; 31432)
 - Bei polyklonalem Primäriserum:
 - Esel anti-Kaninchen IgG-Peroxidase 1:5000 (Pierce, Rockford, IL; 31458)
- ECL (amersham pharmacia; RPN 2106) bzw. ECL-Plus (Bei Verwendung von PVDF-Membranen, amersham pharmacia; RPN 2132)

Durchführung

Die verwendeten Proteinhomogenate wurden im Verhältnis 2:1 mit 3x Stopp-Mix gemischt und für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock bzw. 2 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert, sofern nicht anders in Teil III „Befunde“ vermerkt.

Verwendet wurde für alle Western-Blot-Untersuchungen das Elektrophoresesystem SE 600 der Firma Hoefer Scientific Instruments (Spannungsquelle Hoefer , PS 500XT-230V).

Nach Auftragen der Proben erfolgte eine Elektrophorese in der mit PAGE-Puffer gefüllten Kammer (TE 42, Hoefer Scientific Instruments) bei 25mA, bis die Lauffront das ca. 4cm breite Sammelgel durchwandert hatte. Die Auftrennung im Trenngel wurde bei einer Stromstärke von 60mA durchgeführt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine bei einer Spannung von 14V über Nacht bei Raumtemperatur auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen transferiert.

Im Folgenden ist die Behandlung der Membranen nach erfolgtem Transfer dargestellt:

- 10 Min. Färbung in Ponceau-Rot
- Spülen in Aqua dest.
- 2h Blockieren in Blockierungslösung
- 5 Min spülen in TBST
- 1h Inkubation mit dem Primärantikörper, verdünnt in Antikörper-Inkubationspuffer
- 3x 5 Min Spülen in TBST
- 1h Inkubation mit dem Sekundärantikörper
- 2x5 Min und anschließend 20 Min spülen in TBST
- Spülen in Aqua dest.
- 2 Min Inkubation mit ECL bzw. 5 Min mit ECL-plus
- In der Dunkelkammer Auflegen eines Röntgenfilmes (Fuji 13862 C) in einer Röntgenkassette, Entwicklung des Filmes.

II.4. Nicht-radioaktive Bindungsstudien mit 8-Fluorescein gekoppeltem cGMP bzw. cAMP

Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Puffer A-Cl: 5-fach konzentriert: 125mM Hepes pH 7,5; 500mM KCl; 12,5mM EGTA;
100µM IBMX
- 50mM DTT
- 20µM 8-Fluorescein-cGMP bzw. 8-Fluorescein-cAMP
- 20mM 8-Br-cGMP bzw. 8-Br-cAMP
- 3x Stopp-Mix: 0,375M Tris-HCl pH 6,8; 0,2M DTT; 15% SDS; 20% Glycerin; 0,6mg/dl
Bromphenolblau
- Schaf-Anti-Fluorescein-HRP (NEN, Boston, MA; NEF 710); Verdünnung 1:1000 in
Western-Blot Antikörper-Inkubationspuffer (s.d.)

Durchführung:

Es wurden pro Versuch je 80µg des zu untersuchenden Proteinhomogenates eingesetzt.

Hierzu wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße jeweils gegeben:

- 8µl Puffer A-Cl 5-fach
- 1µl 50mM DTT
- 2µl 20µM 8-Fluorescein-cGMP bzw. -cAMP
- Für die Kompetitionsversuche: 2µl 20mM 8-Br-cGMP bzw. -cAMP
- Aqua dest. Ad 40µl

Somit betragen die Konzentrationen im Gemisch:

25mM Hepes; 100mM KCl; 2,5mM EGTA; 20µM IBMX; 1,25mM DTT; 1µM 8-Fluorescein-cGMP (-cAMP); Ggf. 1mM 8-Br-cGMP (-cAMP)

Dieses Gemisch wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und anschließend auf einem UV-Leuchttisch (Vilber Lourmat TFX-20M, Marine la Vallee, Frankreich) für 6 Minuten mit 312nm bei maximaler Leistung bestrahlt.

Anschließend wurden je 20µl 3x-StoppMix zu den Proben zugegeben und unter Auslassung der Hitzedenaturierung analog des Western-Blot Protokolls fortgefahren, wobei die Konjugate mittels des Anti-Fluorescein Antikörpers detektiert wurden.

II.5. Immunpräzipitation/Proteinisolierung

Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Immunpräzipitationspuffer (IPP): 20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,5; 500mM NaCl; 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 0,02% NaN₃
- Protein G-Agarose (Pierce, 20398)
- 4M NaCl
- 1% SDS
- Triton X-100
- 1x Stoppmix : 1 Teil 3x StoppMix (siehe Kap. II.3.) + 2 Teile Aqua dest.
- Gelfärbelösung: 0,05% Coomassie brilliant Blue; 30% Methanol; 10% Essigsäure in Aqua dest.
- Entfärbelösung: 30% Methanol; 10% Essigsäure in Aqua dest.

Durchführung

Die zu präzipitierenden Proteinhomogenate wurden durch Zentrifugation von evtl. vorhandenen Zelltrümmern oder Proteinaggregationen befreit und durch Zugabe von entsprechenden Mengen an 4M NaCl, 1%SDS und Triton X-100 in ihrer Zusammensetzung dem IPP weitest möglich angeglichen.

Im Folgenden ist die weitere Behandlung der Proben dargestellt:

- Zugabe des präzipitierenden Antikörpers
- 2h Inkubation bei 37°C, dabei leichtes Schütteln der Proben
- Zusatz von je 75µl in IPP dreifach gespülter Protein G-Agarose
- Inkubation über Nacht bei 4°C auf Überkopf-Drehrad
- 2 Minuten bei 865 g zentrifugieren, Überstand asservieren, zum Pellet 500µl IPP geben
- erneut wie oben zentrifugieren, Überstand verwerfen. Spülvorgang sechsmal wiederholen.
- zum so entstandenen Pellet 25µl 1x StoppMix zugeben, 5Min bei 95°C inkubieren (Heizblock)
- Zentrifugieren (s.o.), Überstand als „Präzipitat“ asservieren, zum Pellet erneut 25µl 1x StoppMix zugeben, zentrifugieren und Überstand ebenfalls als „Präzipitat“ asservieren

Zur Proteinisolierung wurde das Präzipitat gelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel für 1h mit Gelfärbelösung gefärbt. Zur Darstellung der Proteinbanden folgte eine Entfärbung des Gels mit Entfärbelösung über mehrere Spülschritte, bis die Banden sichtbar wurden.

Mit einem digitalem Bildaufnahmesystem (Kodak EDAS 120) wurde das Gel zur Dokumentation fotografiert.

Die Bande von Interesse wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

II.6. Immunhistochemie (konventionell)Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- Bouin-Fixierungslösung: 70 Vol.% ges. Pikrinsäure, 25 Vol.% Formalin 37%; 5% Essigsäure
- Chromalaun-Gelatine zur Objektträgerbeschichtung
- Alkoholreihe: Xylolersatz; 100%, 96%, 80% , 70% Ethanol; Aqua dest.; PBS
- 1,2% H₂O₂ in Methanol
- PBS: 0,136M NaCl; 0,05M Na₂HPO₄; mit HCl pH 7,4 eingestellt
- PB: 0,018M KH₂PO₄; 0,082M Na₂HPO₄
- PBS-BSA-NaN₃: 200mg BSA; 100mg NaN₃ in 100ml PBS
- Normalseren verschiedener Spezies:
 - Sofern im Ergebnisteil nicht anders angegeben:
 - 2% Schweineserum in PBS (Rockland, Gilbertsville, PA, D312)
 - 2% Kaninchenserum in PBS (Sigma S Louis, MO, S 2632)
 - Verwendung entsprechend der Spezies des Zweitantikörpers.
- Sekundärantikörper
 - Bei (polyklonalem) Kaninchen-Primärinterum: Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-Biotin 1:250 (Dako E 0353)
 - Bei (monoklonalem) Maus-Erstantikörper: Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Biotin 1:250 (Dako E 0354)
- Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (PAP)
 - Maus-PAP 1:100 bei Maus-Erstantikörper (Linaris, Bettingen, P 0850)
 - Kaninchen-PAP 1:200 bei Kaninchen-Primärinterum (Linaris, Bettingen, Z 0113)
- ABC-Komplex (Avidin-Biotin Komplex, Vectastain Elite PK 6100)
- Entwicklungslösung: PB 0,1M, pH 7,4; DAB 0,47mg/ml; Ammoniumchlorid 3,75 mg/ml; Nickelsulfat 1mM; Glucose 0,2%; Glucose-Oxidase 3,75mg/l
- Eukitt-Eindeckelungsmedium

Durchführung

Von dem in Bouin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2125) 6µm dicke Schnitte angefertigt und auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger oder Histo-Bond (Marienfeld) Objektträger aufgelegt und bei 36°C getrocknet. In absteigender Alkoholreihe fand die Entparaffinierung statt.

Im Folgenden ist der weitere Ablauf dargestellt (Davidoff et al. 1993):

- Blockierung für 30 Minuten mit 2% Normalserum (s.o.) in PBS
- Zugabe des in PBS-BSA-NaN₃ verdünnten Erstantikörpers, Inkubation bei 4°C über Nacht
- Spülen in PBS für 3x 10 Minuten
- Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper (s.o.) für 1h
- Spülen in PBS für 2x 10 Minuten
- Inkubation mit dem entsprechenden PAP-Komplex (s.o.) für 30 Minuten
- Spülen in PBS für 2x 10 Minuten
- Inkubation mit dem ABC-Komplex für 30 Minuten
- Spülen in PBS für 10 Minuten
- Spülen in PB für 10 Minuten
- Entwickeln der Peroxidase-Aktivität unter Sichtkontrolle für ca. 10-30 Minuten
- Spülen in PBS für 3x 5 Minuten
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe
- Eindeckeln in Eukitt

II.7. Immunzytochemie (Fluoreszenz)Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- PBS: 0,136M NaCl; 0,05M Na₂HPO₄; mit HCl pH 7,4 eingestellt
- 4% Paraformaldehyd in PBS
- PBS-BSA-NaN₃ + 0,5% Triton X-100: 0,2% BSA; 0,1% NaN₃; 0,5% Triton X-100 in PBS
- Normales Schweineserum (NSS): 2% Schweineserum in PBS; 0,5% Triton X-100
- Sekundärantikörperlösung
 - Bei (polyklonalem) Kaninchen-Erstantikörper: Ziege-Anti Kaninchen IgG Alexa 488nm 1:1000 (Molecular Probes A-11034)
 - Bei (polyklonalem) Schaf-Erstantikörper: Esel-Anti Ziege IgG Alexa 488nm 1:1000 (Molecular Probes A-11055)
Jeweils in PBS mit 0,5% Triton X-100
- Mowiol-Eideckelungsmedium: 9% Mowiol 4-88 in 0,8M Tris-HCl pH 8,5

Durchführung

Die Fluoreszenz-Immunzytochemie wurde in der vorliegenden Arbeit an aus Nebenhoden isolierten Rinderspermatozoen angewendet. Die in Lockes Salzlösung vorliegende Spermien suspension wurde bei 649g zentrifugiert und der Überstand wurde anschließend verworfen. Die im Pellet konzentrierten Spermien wurden durch Zugabe von 4% PFA/PBS fixiert und auf beschichtete Objektträger (Culture Slides, Falcon 354188) aufgetragen.

Im Folgenden ist der weitere Ablauf dargestellt:

- Die in PFA suspendierten Spermatozoen 40 Minuten bei 4°C Spermien erschütterungsfrei sedimentieren lassen
- Kammern des Objektträgers durch Abklopfen entleeren
- Spülen der Kammern mit je 1 ml PBS, anschließend wieder abklopfen
- bei ca. 36°C Spermien zur besseren Adhäsion komplett eintrocknen lassen
- Spülen der Kammern mit je 1 ml PBS
- Zugabe von 70–150µl NSS, Inkubation bei 4°C über Nacht
- 3x 10 Minuten Spülen der Kammern mit je 1 ml PBS
- Zugabe von je 70–150µl der Sekundärantikörperlösung, 1 Stunde
- 3x 5 Minuten Spülen der Kammern mit je 1 ml PBS
- Eindeckeln der Objektträger mit Mowiol bzw. zum Fotografieren nur mit PBS

Mikroskopiert wurde mit einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des Filtersatzes N°09. Die Fotografien der Präparate entstanden ebenfalls an diesem Mikroskop.

II.8. cGMP-ELISAVerwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Lockes Salzlösung (LSS): 154mM NaCl; 5,6mM KCl; 2,2mM CaCl₂; 1mM MgCl₂; 6mM NaHCO₃; 10mM Glucose; 2mM HEPES in Aqua dest.
- IBMX, SNP, ANP, ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxain-1-one)
- Ethanol absolut
- cGMP-ELISA Kit (Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung, Hamburg)
 - Immuno-Module: Mit Ziege-Anti-Kaninchen IgG beschichtete Microwells (NUNC 469949), in dazu passendem Rahmen (NUNC 460348) mit Deckel (NUNC 263339)
 - E-PBS-Puffer: 0,1M Na₂PO₄; 0,15M NaCl; 0,005M EDTA; 0,2% BSA; 0,01% Thimerosal. pH 7,0
 - cGMP-Antiserum: 1:80000 in E-PBS-Puffer; 0,0005% Metanilgelb
 - cGMP-Biotin: 170 fmol/ml in E-PBS-Puffer; 0,0005% Bromphenolblau
 - cGMP-Standards: 34,02pmol/ml; 11,34pmol/ml; 3,78pmol/ml; 1,26pmol/ml; 0,42pmol/ml; 0,14pmol/ml in LSS (= verwendete Probenmatrix)
 - HRP-Streptavidin-Lösung: 150ng/ml Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase in E-PBS-Puffer
 - HRP-Substratlösung
 - 2M H₂SO₄
 - Waschpuffer: 0,5% NaCl; 0,02 Gew.% Tween20 in H₂O

Durchführung

In LSS suspendierte Nebenhodenspermatozoen des Rindes wurden mit IBMX und/oder SNP, ODQ oder ANP in Eppendorf®-Reaktionsgefäßen stimuliert. IBMX bzw. ODQ wurden 10 Minuten vor SNP oder ANP zugegeben. Die Inkubation fand bei 36°C im Wärmeschrank statt.

Die Beendigung der Stimulation der zu untersuchenden Proben erfolgte durch die Zugabe von absolutem Ethanol im Verhältnis 4:1, so dass eine Ethanolkonzentration von 80% resultierte.

Die Proben wurden 5min bei 2000g zentrifugiert und von jeder Probe zweimal 300µl des Überstandes im Evaporator (Tissue Dryer Edwards ETD4) vollständig eingetrocknet und anschließend mit je 60µl Aqua dest. rekonstituiert.

Von den so erhaltenen Proben wurden je 50µl im ELISA eingesetzt.

Im folgenden ist der weitere Ablauf pro well dargestellt:

- Well mit 375µl E-PBS füllen, 2 Minuten stehen lassen, vollständig entleeren.
- Pipettieren von 50µl Probe bzw. Standard, 50µl cGMP-Biotin und 100µl cGMP-Antiserum
- Inkubation bei 4°C über Nacht (18–24h) im Dunkeln
- Well vollständig entleeren
- Zugabe von 0,2ml HRP-Streptavidin-Lösung
- Inkubation bei 4°C für 30 Minuten im Dunkeln
- Well viermal mit je 375µl kaltem Waschpuffer spülen, vollständig entleeren, anschließend 3–5 Minuten temperieren lassen.
- Zugeben von 0,25ml HRP-Substratlösung
- Inkubation bei Raumtemperatur für 40 Minuten, Dunkelheit
- Abstoppen der Reaktion durch Zugaben von 50µl 2M H₂SO₄
- Auslesen des ELISAs bei 450nm im Photometer (Dynex Revelation), die Auswertung der Daten erfolgte mit der dazugehörigen Software (Version 3.2).

Die untere Detektionsgrenze für cGMP mit dieser Methode liegt bei 0,14pmol/ml, die Kreuzreaktivität mit cAMP beträgt nach Herstellerangaben weniger als 0,0001%.

II.9. Beurteilung der Spermienmotilität

Die in LSS suspendierten Nebenhodenspermien wurden direkt nach ihrer Isolierung für ca. 15min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert, anschließend bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur verwahrt. Die Zeitspanne zwischen Isolierung und Stimulation betrug zwischen 15 Minuten und ca. 4 Stunden.

Von dieser Stammsuspension wurden 50µl auf ein Deckglas (24x60mm, Stärke Nr.1, Marienfeld) aufgetragen. Mit einer Mikroliterpipette wurde die Flüssigkeit abgezogen und durch 50µl LSS ersetzt. Auf diese Weise wurde anschließend noch einmal gespült. Nach erneutem Abziehen der Flüssigkeit wurden die in LSS gelösten Testsubstanzen in ihrer Endkonzentration aufgetragen und die Motilität der Spermien mit einem inversen Mikroskop (Axiovert, Zeiss) beurteilt.

II.10. Liste und Beschreibung der verwendeten Primärantikörper, Proteine und Peptide

cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I)

- Polyklonales PKG-CT Antiserum, Calbiochem (San Diego, CA)/Stressgen (Victoria, BC, Kanada) 539729

Hergestellt in Kaninchen gegen das Peptid DEPPPDDNSGWDIDF aus humaner PKG 1 α (657-671) gekoppelt an KLH. Die PKG 1 α (Molekulargewicht 76kD) und die PKG 1 β (Molekulargewicht 78kD) unterscheiden sich am N-Terminus.

Verdünnung für Western-Blot: 1:4000

Verdünnung für Immunzytochemie 1:100

- Polyklonales PKG -NT Antiserum, Calbiochem (San Diego, CA)/Stressgen (Victoria, BC, Kanada) 539727

Hergestellt in Kaninchen gegen das Peptid LRDLQWALQEKIEE aus humaner und boviner PKG 1 β (4-17)

Verdünnung für Western-Blot: 1:1000

Verdünnung für Immunzytochemie 1:100

zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)

- Polyklonales cGMP-Antiserum

Hergestellt im Schaf gegen cGMP-Thyreoglobulinkonjugat (Tanaka et al. 1997)

Verdünnung in der Immunzytochemie: 1:4000

Verwendeter Sekundärantikörper in diesem Fall Anti-Ziege IgG Alexa 488nm 1:1000 (Molecular Probes, Lexington, KY)

Guanylatcyclase aktivierendes Protein (GCAP)

- Monoklonaler GCAP-1 Antikörper, Transduction Lab (Lexington, KY) G54220
Hergestellt als monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Peptid FRQFFGLKNLSPWASQYVE (38-56) aus humanem GCAP-1 (Als Quelle vom Hersteller angegeben: Subbaraya et al. 1994).
Verdünnung für Western-Blot: 1:1000 bis 1:5000
Verdünnung für Immunhistochemie: 1:500
- Polyklonales GCAP-1 Antiserum „#35/2“,
Hergestellt in Kaninchen gegen rekombinantes bovines GCAP (Frins et al. 1996)
Verdünnung für Western-Blot: 1:2000
Verdünnung für Immunhistochemie: 1:200

lösliche Guanylatcyclase (sGC)

- Polyklonales β 1-sGC Antiserum "AK 6889".
Hergestellt in Kaninchen gegen das Peptid CSRKNTGTEETKQDDD (=Peptid EP990225, Koglin et al. 2003). Gegenüber dem in o.g. Veröffentlichung genannten Antiserum wurde das in der vorliegenden Arbeit verwendete Serum mit dem an eine Sepharose-Säule (Eurogentech, Belgien) gekoppelten Peptid aufgereinigt. Das Antiserum soll humane β 1-sGC erkennen (Molekulargewicht α 1-sGC: 77kD; β 1-sGC: 70kD).
Verdünnung für Western-Blot: 1:2500
Verdünnung für Immunzytochemie: 1:100
- Polyklonales α 1-sGC Antiserum „1200“
Hergestellt in Kaninchen gegen zwei Peptide (EP012493 und EP012494, s.u.) aus dem C-terminalen Ende der humanen α 1-sGC (Koglin et al. 2003).
Verdünnung für Western-Blot: 1:1000

- $\alpha 1 / \beta 1$ -sGC rekombinantes Protein (Koglin et al. 2003)
- $\beta 1$ -sGC Peptid "EP990225" (Koglin et al. 2003), CSRKNTGTEETKQDDD (AS 605-619 aus humaner $\beta 1$ -sGC).
Präabsorption im Western-Blot: 5 μ g Peptid auf 1 μ l unverdünntes Antiserum
Präabsorption in der Immunzytochemie: 10 μ g Peptid auf 1 μ l unverdünntes Antiserum
- $\alpha 1$ -sGC Peptid "EP012493" (Koglin et al. 2003), FTPRSREELPPNFP (aus dem C-terminalen Ende humaner $\alpha 1$ -sGC)
- $\alpha 1$ -sGC Peptid "EP012494" (Koglin et al. 2003), CFQKKDVEDGNANFLGKASGID (aus dem C-terminalen Ende humaner $\alpha 1$ -sGC)
Präabsorption im Western Blot: je 30 μ g Peptid EP012493 und EP012494 auf 1 μ l unverdünntes Antiserum

II.11. Liste der verwendeten Chemikalien

8-Br-cAMP, Biolog life science institute (Bremen, Deutschland), B007

8-Br-cGMP, Biolog life science institute (Bremen, Deutschland), B004

8-Fluorecsein-cAMP, Biolog life science institute (Bremen, Deutschland), F002

8-Fluorescein-cGMP, Biolog life science institute (Bremen, Deutschland), F001

Acrylamid/Bis (37,5:1), Serva Feinchemikalien GmbH&Co KG (Heidelberg, Deutschland), 10688

Albumin, bovines Serum-, Sigma (St Louis, MO) A-7906

Ammoniumchlorid, Sigma (St Louis, MO) A-4514

Ammoniumpersulfat, Bio-Rad (München, Deutschland), 161-0700

ANF (ANP), Bachem, 4030380.1000

Bromphenolblau, Merck (Darmstadt, Deutschland), 108122

CaCl₂, Merck (Darmstadt, Deutschland), 103278

Coomassie brilliant blue G 250, Merck (Darmstadt, Deutschland), 1.15444.0025

DAB Enhanced DAB Substrate Kit, Pierce ImmunoPure, 34065

Dithiothreitol (DTT), Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Großbritannien), 17-1318-02

EDTA, Sigma (St Louis, MO), E-5134

EGTA, Sigma (St Louis, MO), E-8145

Essigsäure, Riedel de Haen AG (Seelze, Deutschland), 27225

Ethanol absolut, Riedel de Haen (Seelze, Deutschland), 32205

Formalin 37%, Merck (Darmstadt, Deutschland), 1.03999.1000

Glucose (D-+), Merck (Darmstadt, Deutschland), 8342

Glucose-Oxidase, Sigma (St Louis, MO), G-2133

Glycerin, Sigma (St Louis, MO), G-5516

Glycin, Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe, Deutschland), 3908.2

H₂O₂, Merck (Darmstadt, Deutschland), 1.06009.2500

Hank's Buffered Saline Solution, Gibco (Grand Island, NY)/Invitrogen, 14175103

HCl 2mol/l, Merck (Darmstadt, Deutschland), 1.09063.1000

HEPES, Serva Feinchemikalien GmbH&Co KG (Heidelberg, Deutschland) 25245

Isobutylmethylxanthin (IBMX), Sigma (St Louis, MO), I-5879

KCl, Merck (Darmstadt, Deutschland), 4936

KH₂PO₄, Merck (Darmstadt, Deutschland), 4873

Methanol, Merck (Darmstadt, Deutschland), 1.06009.2500

MgCl₂, Merck (Darmstadt, Deutschland), 1.05833.0250

Mowiol 4-88, Polyscience Inc. (Warrington, PA), 17951

Na₂HPO₄, Merck (Darmstadt, Deutschland) 1.06580.1000

NaCl, Mallinckrodt Baker B.v. (Deventer, Niederlande), 0278

NaF, Sigma (St Louis, MO), S-1504

NaH₂PO₄, Merck (Darmstadt, Deutschland), 6346.1000

NaHCO₃, Merck (Darmstadt, Deutschland), 6329

NaN₃, Sigma (St Louis, MO), S-2002

Nickelsulfat, Merck (Darmstadt, Deutschland),

ODQ, Alexis Corporation (Lausen, Schweiz), 270-034-M010

Paraformaldehyd, Merck (Darmstadt, Deutschland), 1.04005.1000

Pikrinsäure, gesättigt, Merck (Darmstadt, Deutschland), 1.00604.0500

PMSF, Amersham (Buckinghamshire, GB)

Ponceau-Rot, Serva Feinchemikalien GmbH&Co KG (Heidelberg, Deutschland), 33427

Protein G, immobilized ImmunoPure® Pierce (Rockford, IL), 20398

SDS (Natriumdodecylsulfat), Sigma (St Louis, MO), L-3771

SNP (Nitroprussid-Natrium), Fluka AG (Buchs, Schweiz), 71780

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin), Sigma (St Louis, MO), T-9281

Thimerosal, Sigma (St Louis, MO), T-8784

Tris, Merck (Darmstadt, Deutschland), 108382

Triton X-100, Merck (Darmstadt, Deutschland) 1.12298.0101

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaureat), Sigma (St Louis, MO), P-1379

Xylolersatz XEM-200, Vogel GmbH&Co KG (Gießen, Deutschland), ND-HS-200

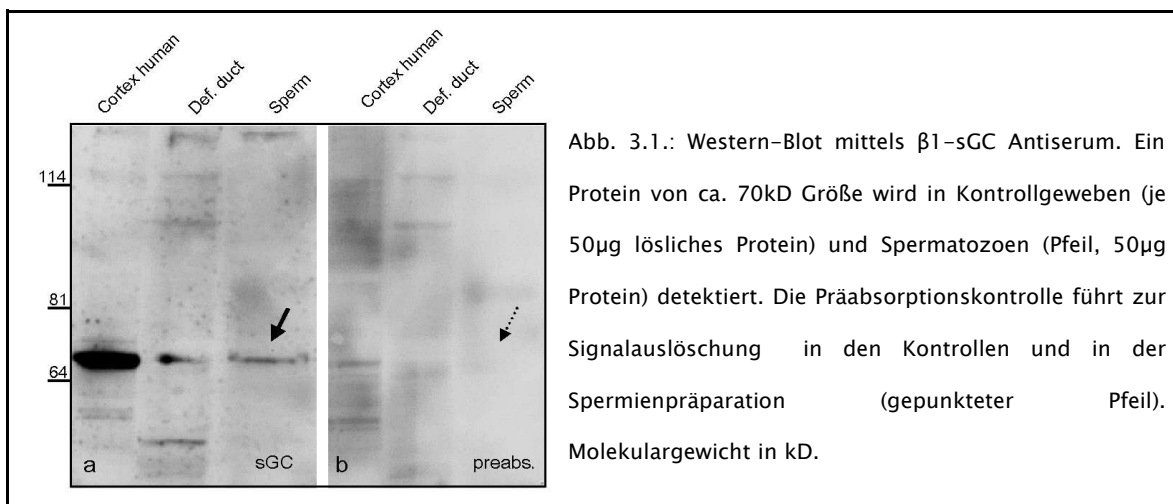
III. ERGEBNISSE

III.1 lösliche Guanylatcyclase (sGC)

Als eine mögliche Quelle von cGMP in Spermatozoen des Rindes wurde das Vorhandensein der löslichen Guanylatcyclase (sGC) in in diesen Zellen untersucht. Bisherige Arbeiten konnten Effekte von NO-freisetzenden Substanzen, also potentiellen sGC-Aktivatoren, auf verschiedene Funktionen von Spermatozoen demonstrieren.

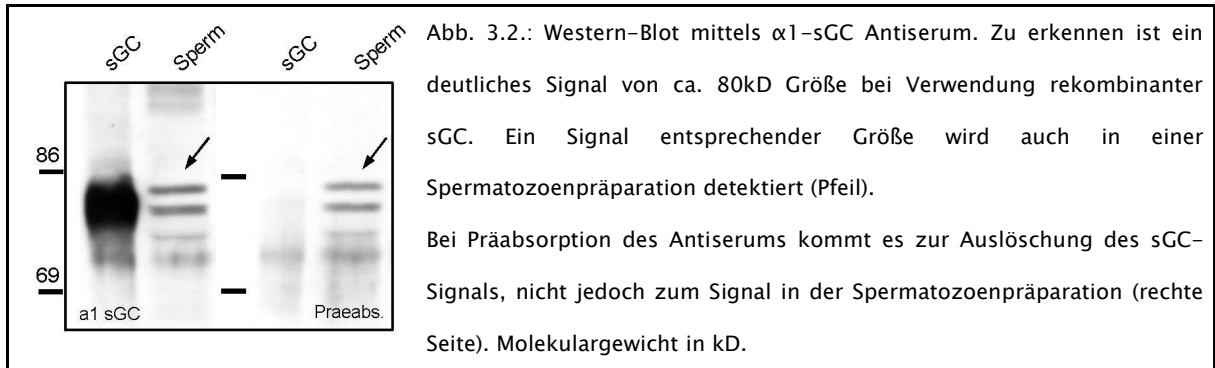
III.1.1 Western-Blot Untersuchungen

Es standen Antikörper gegen die $\alpha 1$ - und die $\beta 1$ -Untereinheit des Enzyms zur Verfügung. Mit Hilfe des $\beta 1$ -sGC Antiserums wurde im Western Blot ein ca. 70kD großes Protein, also in der für $\beta 1$ -sGC zu erwartenden Größe, sowohl in Großhirnrinde und Samenstrang als auch in Spermatozoen gefunden. Durch Präabsorption mit einem $\beta 1$ -sGC Peptid erfolgte die Auslöschung des Signals in allen drei Gewebeproben (Abb. 3.1.), es ist somit als spezifisch zu werten. Auch bei Verwendung rekombinanter sGC als Positivkontrolle kam es zu einer Anfärbung der $\beta 1$ -Untereinheit (Daten nicht gezeigt).



Das verwendete anti- $\alpha 1$ sGC Antiserum führte im Western-Blot zu einer deutlichen Anfärbung der $\alpha 1$ -Untereinheit der eingesetzten rekombinanten sGC. Ein Signal in derselben Höhe wurde auch in einer Spermatozoenpräparation detektiert. Wurde das Antiserum mit

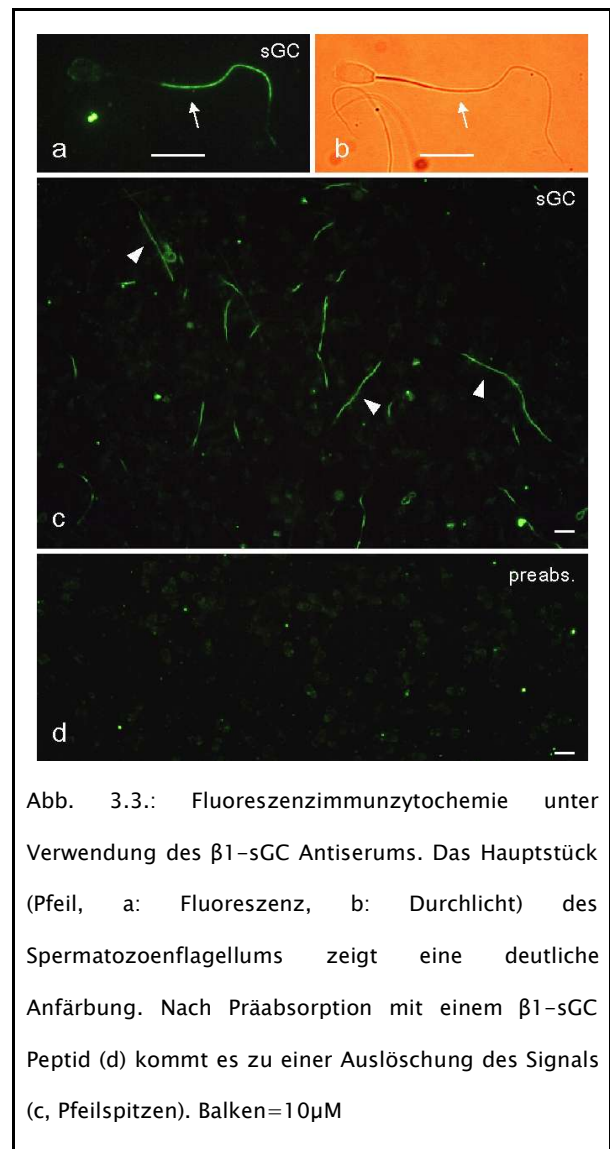
$\alpha 1$ -sGC Peptiden präinkubiert, führte dies zu einer Auslöschung des Signals im Falle der rekombinanten sGC-Probe, das in den Spermien detektierte Signal blieb jedoch bestehen (Abb. 3.2.) und ist somit als unspezifisch zu bewerten.



III.1.2. Immunzytochemie

Das im Western-Blot als spezifisch befundene $\beta 1$ -sGC Antiserum wurde in immunzytochemischen Untersuchungen an isolierten Spermatozoen aus dem Nebenhoden des Rindes verwendet. Hierbei zeigte sich eine deutliche Anfärbung des Hauptstückes des Flagellums (Abb. 3.3 a,b, Pfeile).

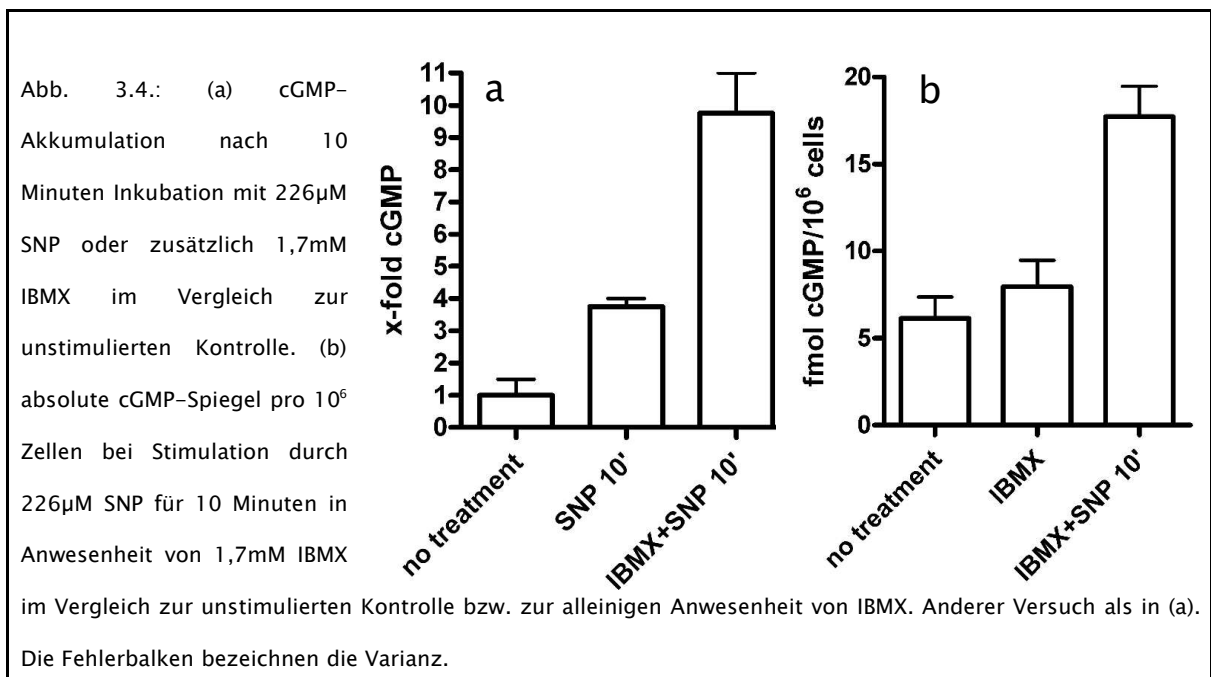
Die Spezifität dieses Signals wurde durch die Präabsorptionskontrolle bestätigt: Durch Inkubation des Antikörpers mit einem $\beta 1$ -sGC Peptid kam es zur Auslöschung des Signals im Hauptstück des Flagellums (Abb. 3.3 d im Vergleich zu c).



III.1.3. Nachweis NO-abhängiger cGMP-Akkumulation

III.1.3.a) ELISA-Untersuchungen

Im folgenden wurde die Guanylatcyclyaseaktivität in Rinderspermatozoen untersucht. Hierzu wurde die cGMP-Akkumulation in Anwesenheit verschiedener Aktivatoren bzw. Inhibitoren der löslichen sowie membrangebundener Guanylatcyclyasen mittels ELISA bestimmt.



Nach 10-minütiger Inkubation mit 226µM des NO-Donors SNP (Ignarro et al. 2002) zeigte sich eine 3,8-fach höhere cGMP-Konzentration als in der unstimulierten Kontrolle (Abb. 3.4.). War neben SNP zusätzlich der Phosphodiesteraseinhibitors IBMX (1,7mM) anwesend, so war die cGMP-Konzentration nach 10 Minuten 9,8-fach höher als in der Kontrolle.

In einem der Versuche wurde die absolute cGMP-Konzentration pro eine Million Spermienzellen bestimmt. Hierbei ergab sich ein Wert von 6,15fmol cGMP/10⁶ Zellen unter Kontrollbedingungen. In Anwesenheit von 1,7mM IBMX stieg dieser Wert auf 7,94fmol cGMP/10⁶ Zellen (1,3-fach erhöht), während die zusätzliche Stimulation durch 226µM SNP für 10 Minuten eine cGMP-Konzentration von 17,74fmol cGMP/10⁶ Zellen (2,89-fach erhöht) erwirkte.

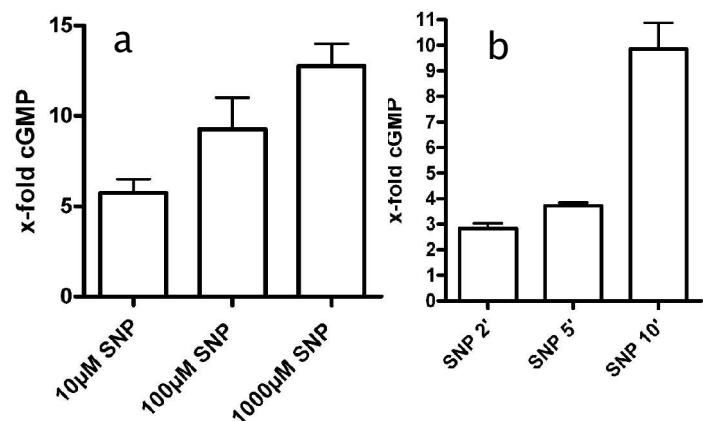
Die folgenden Untersuchungen wurden aufgrund der höheren erreichten cGMP-Konzentrationen und somit der größeren Genauigkeit der Messungen in Anwesenheit von 1,7mM IBMX durchgeführt. Die Messungen wurden jeweils auf Proben ohne Zusatz pharmakologischer Substanzen bezogen.

Für die SNP-induzierte cGMP-Akkumulation konnte sowohl die Konzentrations- als auch die Zeitabhängigkeit nachgewiesen werden (Abb. 3.5 a,b). 10µM SNP führten nach 10-minütiger Inkubation zu einem 6,1-fachen cGMP-Konzentrationsanstieg, während ein 9,4-facher Konzentrationsanstieg bei 100µM SNP beobachtet wurde. In Anwesenheit von 1000µM SNP erhöhte sich die cGMP-Konzentration 13,1-fach.

Nach zwei Minuten Inkubation mit 226µM SNP zeigte sich eine 2,7-fach, nach fünf Minuten eine 3,8-fach und nach zehn Minuten eine 10-fach höhere cGMP-Konzentration als in der Kontrolle.

Abb. 3.5.:

Konzentrations- (a) und Zeitabhängigkeit (b) der SNP-induzierten cGMP-Akkumulation. Die Spermatozoenproben wurden in Anwesenheit von 1,7mM IBMX für 10 Minuten bzw. für die angegebene Zeit mit SNP in einer Konzentration von 226µM bzw. in der angegebenen Konzentration inkubiert. Die Daten

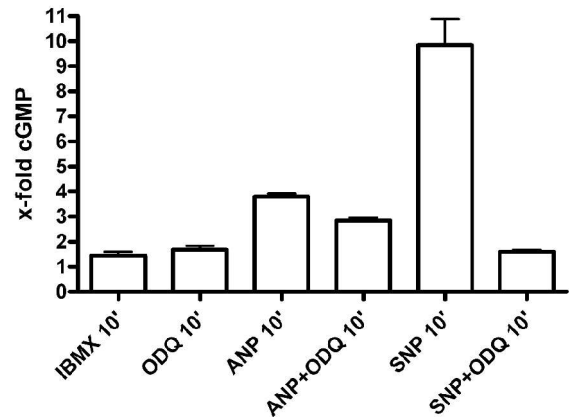


stammen aus zwei Messreihen mit je zwei Parallelansätzen. Die Steigerung der cGMP-Konzentration bezieht sich auf die im Text angegebene Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Varianz an.

Des weiteren konnte die Hemmbarkeit der NO-induzierten cGMP-Produktion durch den sGC-Inhibitor ODQ gezeigt werden. (Abb. 3.6.) Als Kontrolle wurde die cGMP-Produktion sGC-unabhängig durch den Aktivator der membrangebundenen Guanylatcyclase A (GC-A), ANP, stimuliert. In Anwesenheit von je 1,6mM IBMX und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die cGMP-Konzentration durch 226µM SNP 9,8-fach gesteigert, durch gleichzeitige

Präsenz von 19µM ODQ lag der gemessene cGMP-Spiegel in der selben Größenordnung (1,6-fach) wie in der Anwesenheit von ausschließlich IBMX (1,4-fach) bzw. von IBMX und ODQ ohne SNP (1,7-fach). Die gemessene 3,8-fache Steigerung der cGMP-Konzentration durch 2,2µM ANP wurde durch den Zusatz von 19µM ODQ nur geringfügig reduziert (auf das 2,84-fache der Kontrolle).

Abb. 3.6.: Hemmbarkeit der SNP-induzierten cGMP-Akkumulation durch ODQ. Die Spermatozoenproben wurden im Anwesenheit von 1,7mM IBMX für 10 Minuten mit den angegebenen Substanzen (ODQ 19µM; ANP 2,2µM; SNP 226µM) inkubiert. Die Daten stammen aus zwei Messreihen mit je zwei Parallelansätzen. Die Steigerung der cGMP-Konzentration bezieht sich auf die im Text angegebene Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Varianz an.



Die statistische Signifikanz der beobachteten stimulierenden Wirkungen des NO-Donors SNP auf die cGMP-Produktion in Spermatozoen des Rindes konnte belegt werden. Abb. 3.7. zeigt die Ergebnisse aller hierzu durchgeführten Versuche als Punktwolken. IBMX wurde in einer Konzentration von 1,7mM verwendet, SNP in Konzentrationen von 100µM bis 1000µM für 2 bis 30 Minuten Inkubationsdauer.

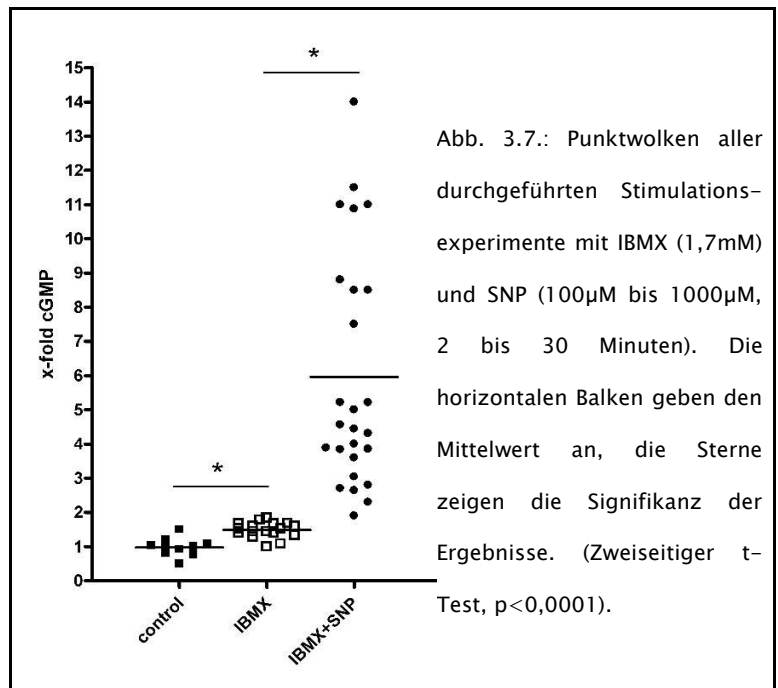


Abb. 3.7.: Punktwolken aller durchgeführten Stimulationsexperimente mit IBMX (1,7mM) und SNP (100µM bis 1000µM, 2 bis 30 Minuten). Die horizontalen Balken geben den Mittelwert an, die Sterne zeigen die Signifikanz der Ergebnisse. (Zweiseitiger t-Test, p<0,0001).

In Abb. 3.8. sind die Ergebnisse des t-Testes für die Vergleiche der verschiedenen Messreihen wiedergegeben. Die statistischen Untersuchungen wurden mit der GraphPad Prism® Software Version 4.01 durchgeführt.

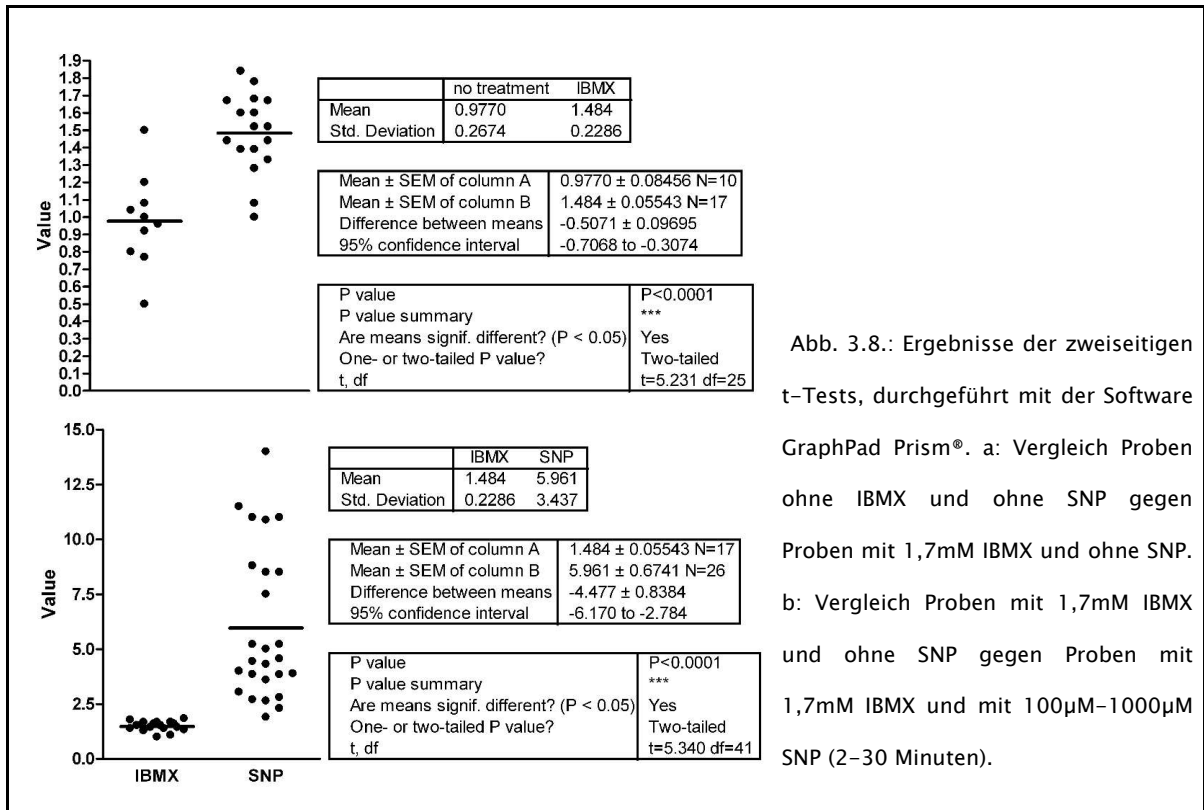
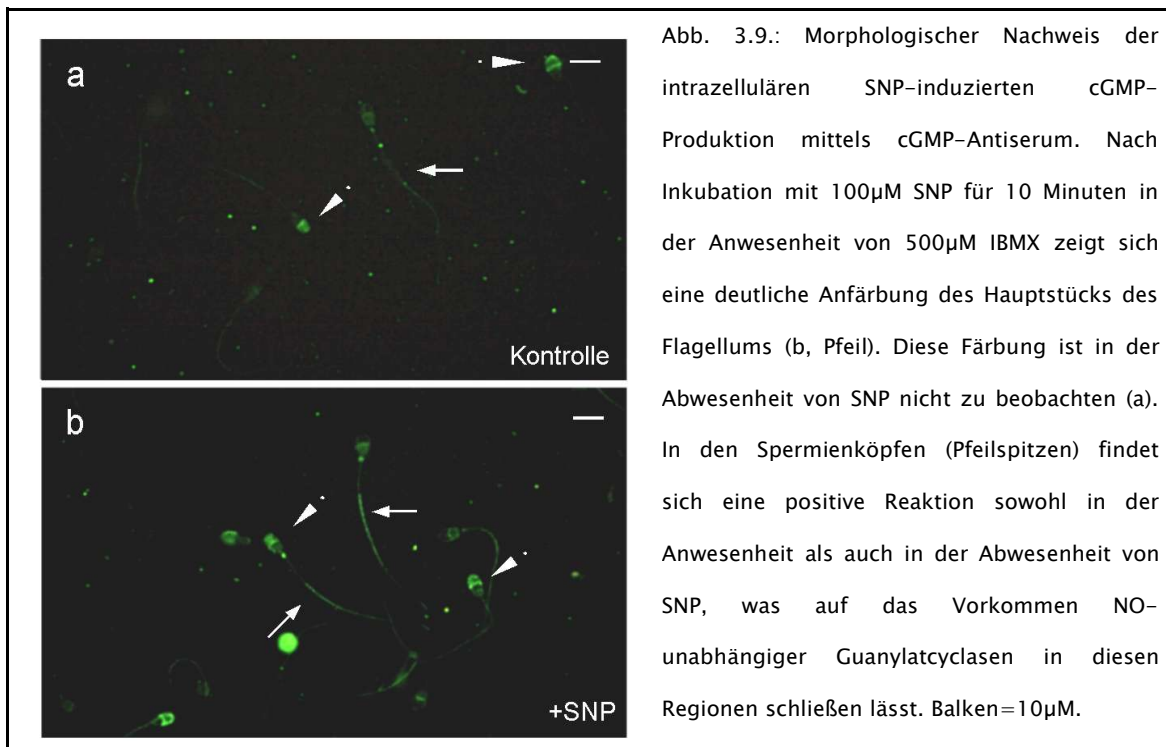


Abb. 3.8.: Ergebnisse der zweiseitigen t-Tests, durchgeführt mit der Software GraphPad Prism®. a: Vergleich Proben ohne IBMX und ohne SNP gegen Proben mit 1,7mM IBMX und ohne SNP. b: Vergleich Proben mit 1,7mM IBMX und ohne SNP gegen Proben mit 1,7mM IBMX und mit 100µM-1000µM SNP (2-30 Minuten).

III.1.3.b) cGMP-Immunzytochemie

Die oben aufgeführten Daten aus ELISA-Experimenten konnten die NO-induzierte cGMP-Produktion in Spermatozoensuspensionen belegen. Der intrazelluläre cGMP-Anstieg in den Spermatozoen konnte durch cGMP-Immunzytochemie zusätzlich auf morphologischer Ebene sichtbar gemacht werden (Abb. 3.9). Die cGMP-Immunhistochemie ist in der Vergangenheit an verschiedenen Geweben erfolgreich verwendet worden (De Vente et al. 1993; Tanaka et al. 1997, Cvek et al. 1998).

Es wurde eine SNP-abhängige cGMP-spezifische Färbung im Hauptstücks des Flagellums gefunden, also in der selben Region, in der die lösliche Guanylatcylase mittels Immunzytochemie nachgewiesen werden konnte (s.o.). Eine SNP-unabhängige Färbung von Spermatozoenköpfen legt das gleichzeitige Vorkommen weiterer Guanylatcyclasen nahe, wie sich auch durch die oben beschriebene Stimulierbarkeit der cGMP-Produktion durch ANP vermuten lässt.



III.1.4. Beurteilung der Spermienmotilität

Die mittels der oben beschriebenen ELISA-Untersuchungen gefundenen Effekte des NO-Donors und sGC-Aktivators SNP auf die Funktion von Rinderspermien konnten durch direkte lichtmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Hierbei zeigte sich eine steigende Zunahme der Spermienmotilität bei Zugabe von bis zu 10µM SNP zu in LSS suspendierten Nebenhodenspermatozoen (Tab. 3.1.). Der subjektive Motilitätseindruck wurde von mehreren unabhängigen Beobachtern bestätigt. SNP-Konzentrationen über 20µM führten zu keiner Steigerung der Spermienmotilität. In SNP-Dosen um 1mM konnte eine Abnahme der Spermienmotilität beobachtet werden.

SNP [µM]	0	1,25	2,5	5	10	20	40	80
Motilität		+	+	++	+++	+		

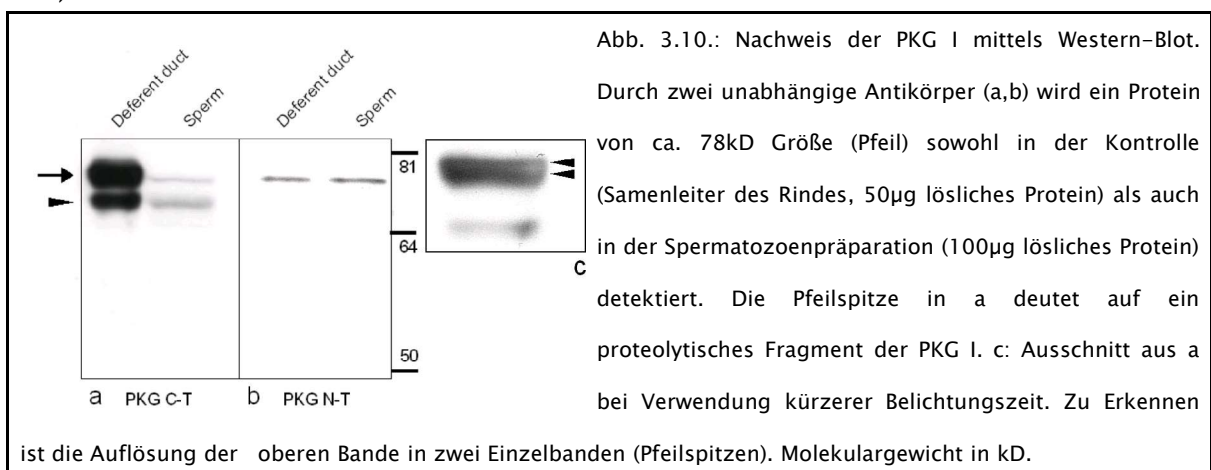
III.2. cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I)

In einer Vielzahl von somatischen Zellen ist die cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I) als wichtigstes cGMP-bindendes und cGMP-Effekte vermittelndes Protein bekannt (Carvajal et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen dieses Proteins in Spermatozoen des Rindes untersucht.

III.2.1 Western-Blot Untersuchungen

Es standen zwei verschiedene polyklonale Antikörper gegen die PKG I zur Verfügung. Einer ist gegen das C-terminale Peptid DEPPPDDNSGWDIDF aus humaner PKG 1 α (657–671, in dieser Region sequenzidentisch zu PKG 1 β) generiert worden und wird im folgenden als PKG-CT Antikörper bezeichnet, der andere ist gegen das N-terminale Peptid LRDQLQWALQEKIEE aus humaner PKG 1 β (4–17) generiert worden und wird im folgenden als PKG-NT Antikörper bezeichnet. PKG 1 α (Molekulargewicht 76kD) und PKG 1 β (Molekulargewicht 78kD) unterscheiden sich in ihrer Sequenz am N-Terminus.

Mit beiden Antikörpern kam in Western-Blot Untersuchungen ein ca. 78kD großes Protein sowohl in den Kontrollgeweben als auch in Spermatozoen zur Darstellung (Abb. 3.10 a,b, Pfeil).



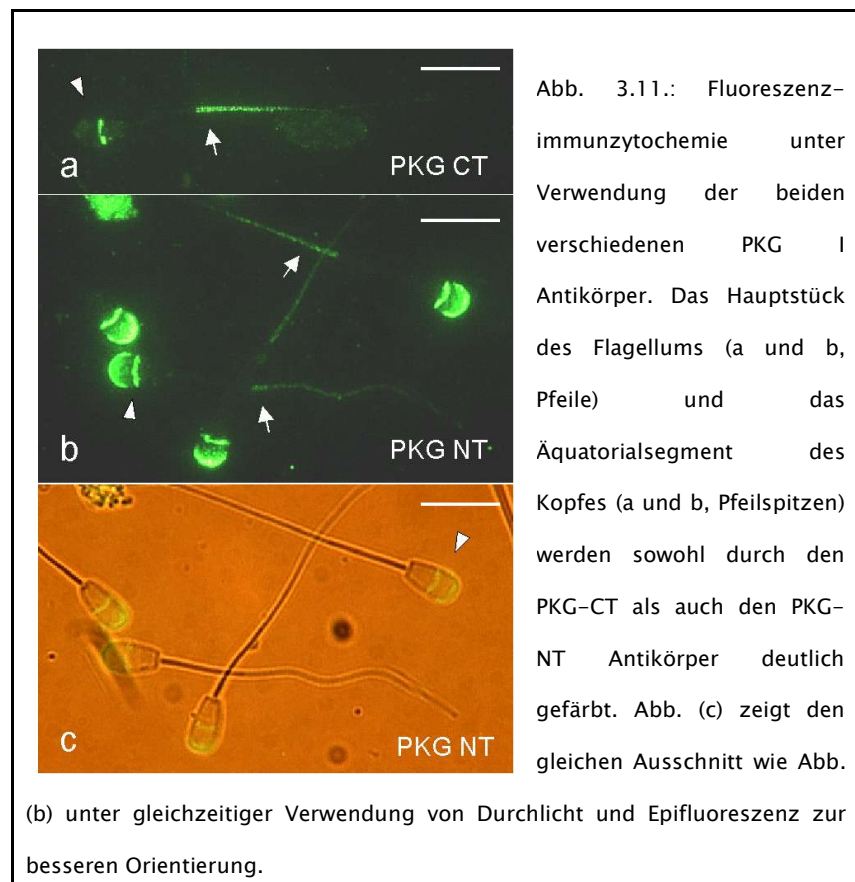
Durch den PKG-CT Antikörper wird zusätzlich ein Protein von etwas geringerem Molekulargewicht erkannt (Abb. 3.10 a, Pfeilspitze). Hierbei handelt es sich vermutlich um

ein proteolytisches Fragment der PKG I, das Vorkommen eines solchen Fragmentes ist in der Swiss-Prot Datenbank (www.expasy.ch; Primary accession number P00516) erwähnt. Dass die in Abb. 3.10 a zu erkennende Doppelbande nicht die beiden PKG I Isoformen α und β repräsentiert, wird bei Verwendung einer kürzeren Belichtungszeit und stärkerer Vergrößerung sichtbar (Abb. 3.10 c). Hier zeigt sich die Auflösung der oberen Bande in zwei Einzelbanden (Abb. 3.10 c), die durch die genannten Isoformen generiert werden.

III.2.2 Immunzytochemie

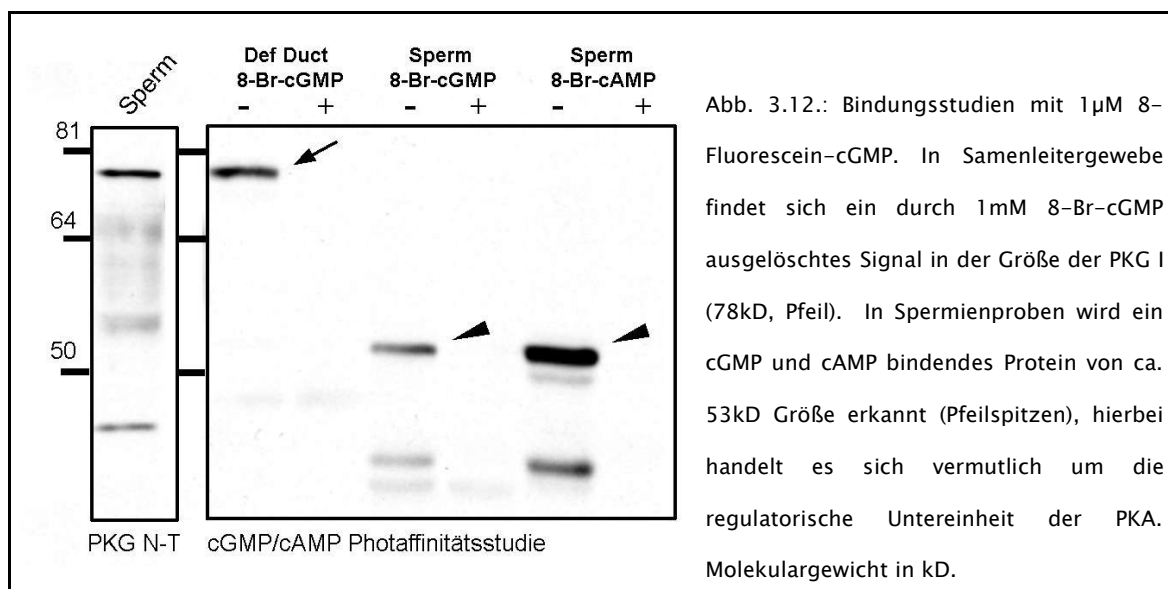
Die beiden Antikörper PKG-CT und PKG-NT wurden auch in immunzytochemischen Untersuchungen an Rinderspermatozoen verwendet (Abb. 3.11.). Durch beide Antikörper kommt es übereinstimmend zur Färbung des Hauptstückes des Flagellums (Abb. 3.11, Pfeile), also genau der Region, in der auch die sGC und die NO-induzierte cGMP-Produktion demonstriert werden konnte (s.o.).

Ebenfalls durch beide Antikörper gefärbt wird das Äquatoralsegment des Kopfes (Abb. 3.11., Pfeilspitzen), wobei im Falle der Verwendung des N-terminalen Antikörpers die Färbung auch des vorderen Bereiches des Akrosoms deutlicher ausgeprägt ist.



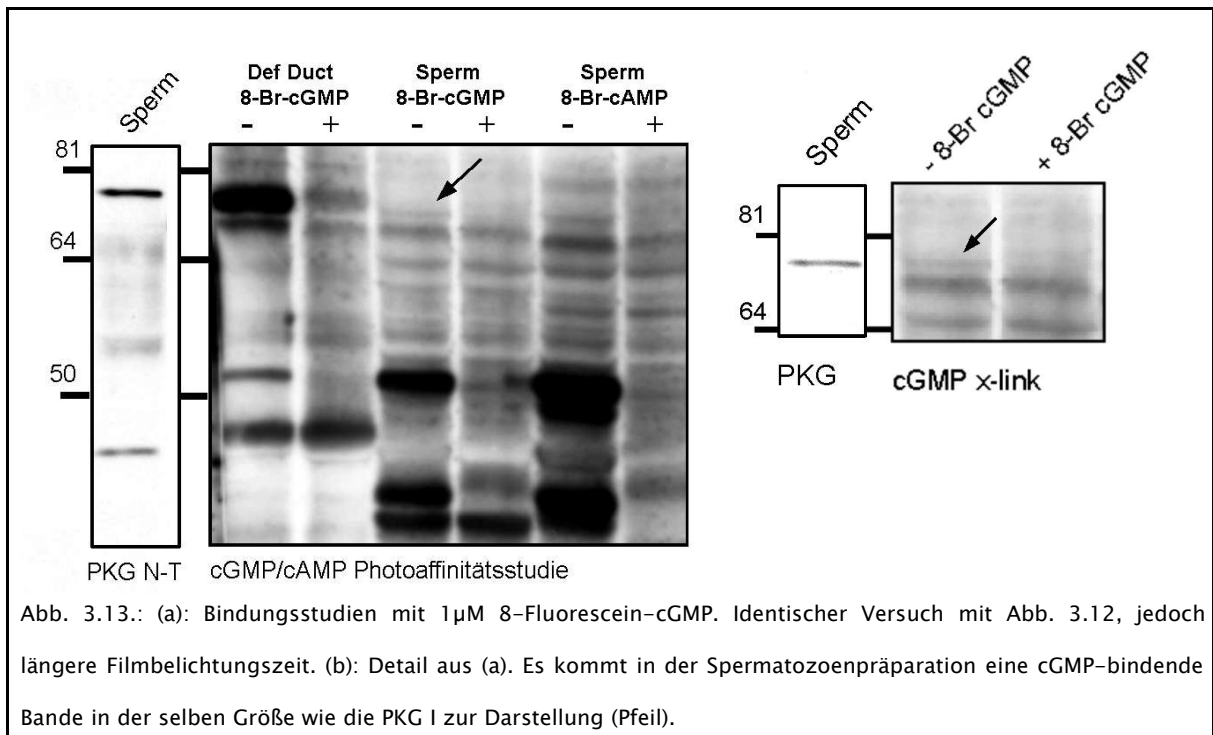
III.2.3 nicht-radioaktive cGMP-Bindungsstudien

Um den Nachweis der PKG I in Spermatozoen des Rindes noch weiter abzusichern, wurden cGMP-Bindungsstudien durchgeführt. Hierzu wurde eine neue, auf früheren ^{125}I - und ^{32}P -Photoaffinitätsstudien (Müller et al. 2002, Middendorff et al. 2002) basierende, Methode etabliert. In diesen Untersuchungen wurde 8-Fluoreszein gekoppeltes cGMP durch UV-Bestrahlung kovalent an seine Bindungsstellen gebunden und anschließend mit Hilfe eines anti-Fluoreszein Antikörpers das gebundene cGMP am entsprechenden Zielprotein im konventionellen Western-Blot nachgewiesen. Der besseren Übersicht halber ist in Abb. 3.12. das Ergebnis einer solchen Untersuchung bei kurzer Belichtung des Röntgenfilms wiedergegeben. Deutlich zu erkennen ist eine ca. 78kD große Bande in Samenleitergewebe, die bei gleichzeitiger Gabe von nicht-Fluoreszein gekoppeltem 8-Br-cGMP im tausendfachen Überschuss nicht zur Darstellung kommt. Die Bande hat die selbe Größe wie das im PKG-Western-Blot detektierte Signal. Bei der verwendeten kurzen Belichtungszeit ist eine derartige Bande in Spermatozoenpräparationen nicht zu erkennen, hier kommt eine Bande von ca. 53kD zur Darstellung. Dieses Signal ist bei der Verwendung von 8-Fluoreszein cAMP stärker ausgeprägt und dürfte die regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA, Foss et al. 1994) repräsentieren.



Bei verlängerter Belichtungszeit kommt eine Vielzahl an weiteren Banden zur Darstellung (Abb. 3.13). Wie oben beschrieben sind jedoch nur diejenigen Signale als spezifisch zu bewerten, bei denen es unter Überschuss von 8-Br-cGMP zu einer Auslöschung kommt.

In Abb. 3.13 zeigt sich die PKG I nun auch als schwaches Signal in der Spermatozoenpräparation (Abb. 3.13 b, Pfeil). Des Weiteren ist das der PKA zugeschriebene Signal nun ebenfalls in Samenleitergewebe nachweisbar.



III.3. Guanylatcyclase aktivierendes Protein 1 (GCAP-1)

Als Bestandteil des in der Einführung beschriebenen retinalen cGMP-Signalweges wurde das Vorkommen des Guanylatcyclase aktivierenden Proteins 1 (GCAP 1) in Spermatozoen des Rindes untersucht. Die hierzu durchgeführten Versuche sind von besonderem methodischen Interesse, da sie exemplarisch ein zentrales Problem der Immunodetektion illustrieren, nämlich die Frage nach der Spezifität des beobachteten Signals.

III.3.A. Untersuchungen mit dem monoklonalen GCAP-1 Antikörper

Den Anfang machten Untersuchungen mit einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen das GCAP-1 (Transduction Lab, Lexington, KY). Laut Datenblatt des Herstellers wurde dieser Antikörper gegen das Peptid FRQFFGLKNLSPWASQYVE (38-56) aus humanem GCAP-1 generiert.

III.3.A.1. Immunhistochemie

Entsprechend der Beschreibung des Guanylatcyclase aktivierenden Proteins 1 als Komponente des retinalen cGMP-Signalsystems fand sich in immunhistochemischen Untersuchungen an Retinaschnitten des Rindes eine deutliche Anfärbung der Stäbchen und Zapfen (Abb. 3.14.).

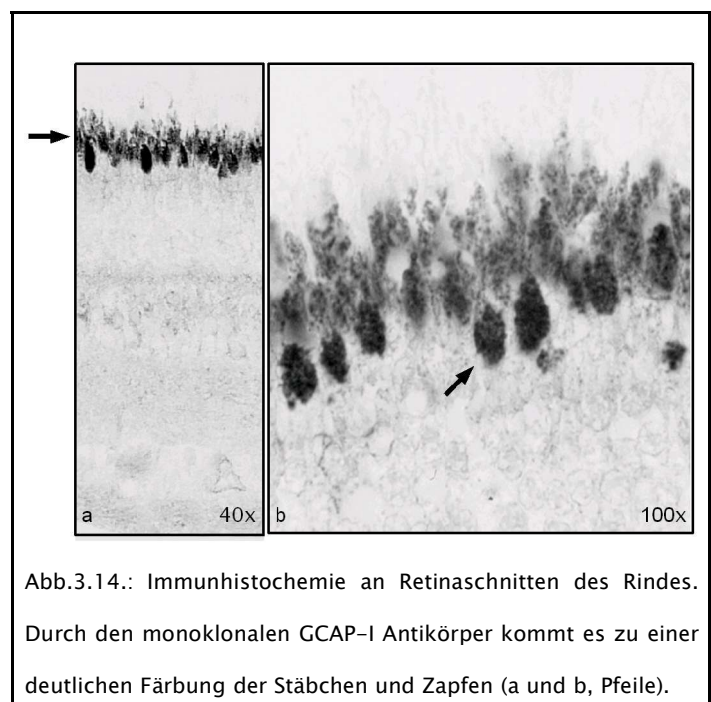


Abb.3.14.: Immunhistochemie an Retinaschnitten des Rindes. Durch den monoklonalen GCAP-I Antikörper kommt es zu einer deutlichen Färbung der Stäbchen und Zapfen (a und b, Pfeile).

Nachdem die Ergebnisse an Retinagewebe mit den Erwartungen übereinstimmten und somit die Spezifität des Antikörpers nahe legen, wurden weitere immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich an Dünnschnitten des Rinderhodens eine hochselektive Färbung der kontraktile Elemente wie der glatten Muskelzellen der Gefäße oder der peritubulären Zellen. Eine Färbung der Keimzellen war nicht zu beobachten (Abb. 3.15.).

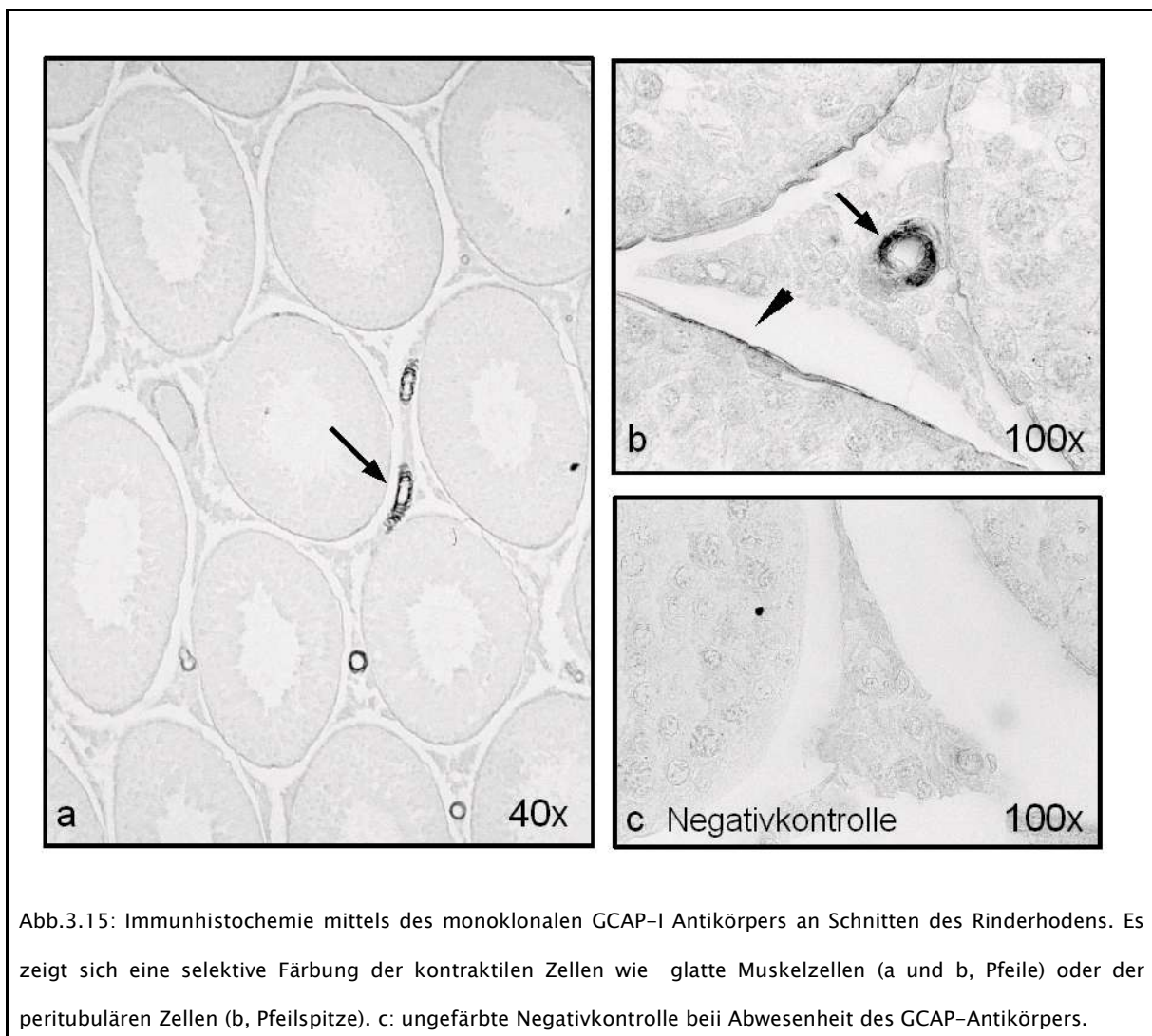
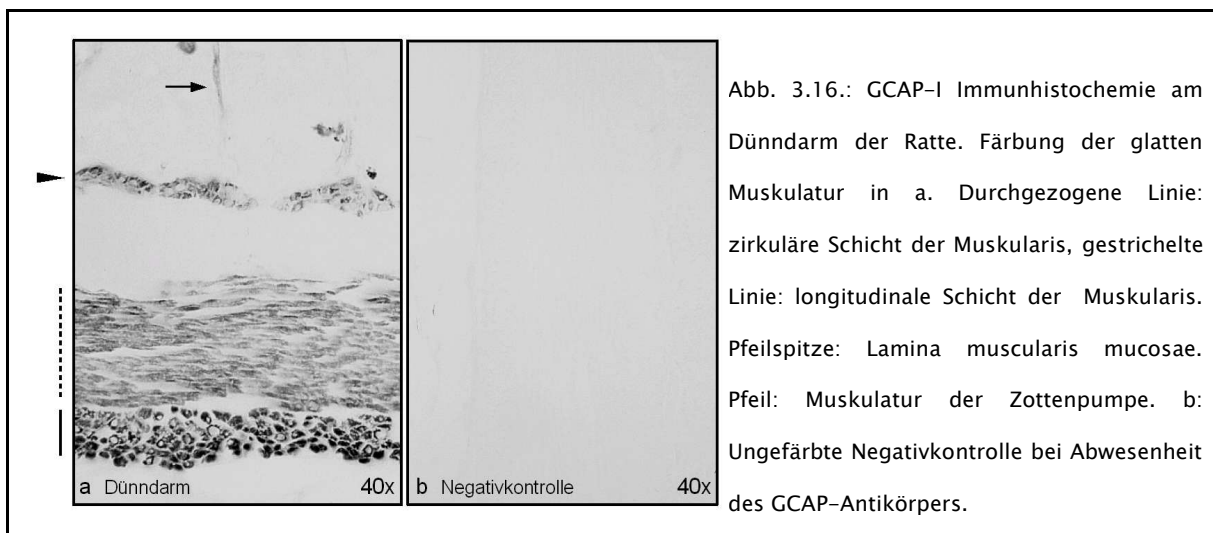
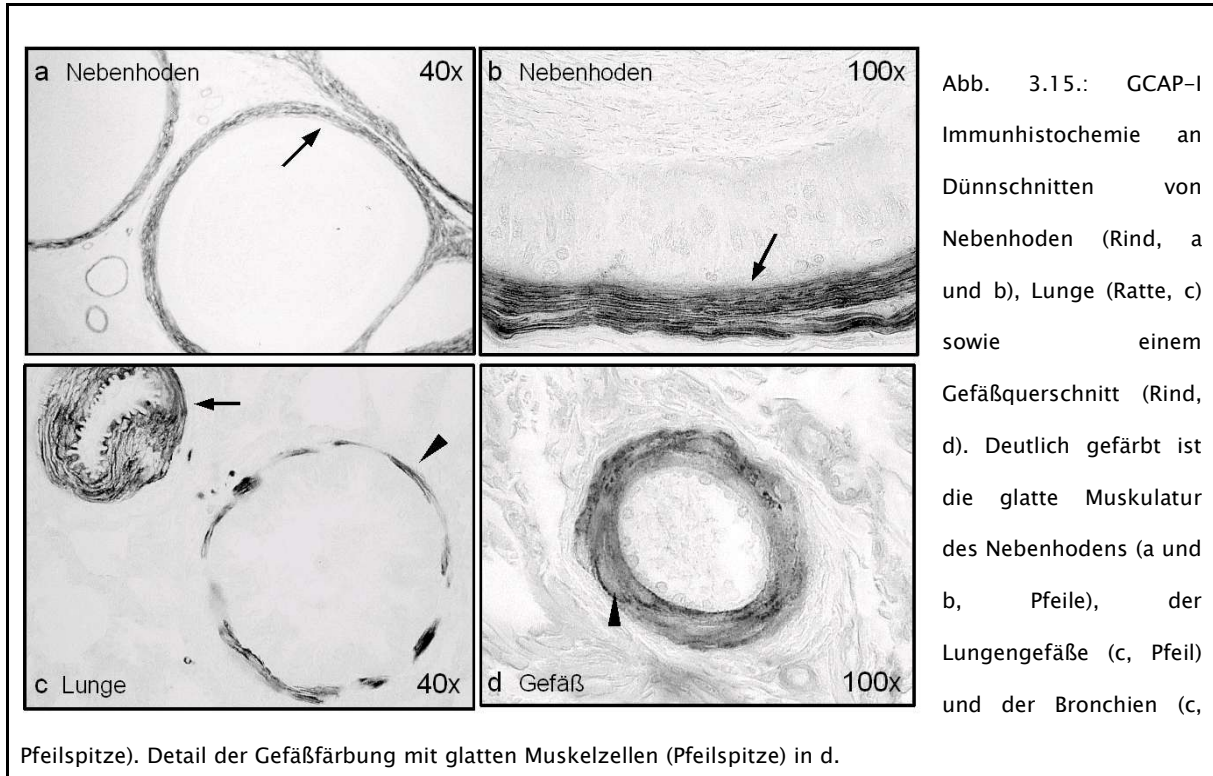


Abb.3.15: Immunhistochemie mittels des monoklonalen GCAP-I Antikörpers an Schnitten des Rinderhodens. Es zeigt sich eine selektive Färbung der kontraktile Zellen wie glatte Muskelzellen (a und b, Pfeile) oder der peritubulären Zellen (b, Pfeilspitze). c: ungefärbte Negativkontrolle bei Abwesenheit des GCAP-Antikörpers.

III.3. Guanylatcyclase aktivierendes Protein 1 (GCAP 1)

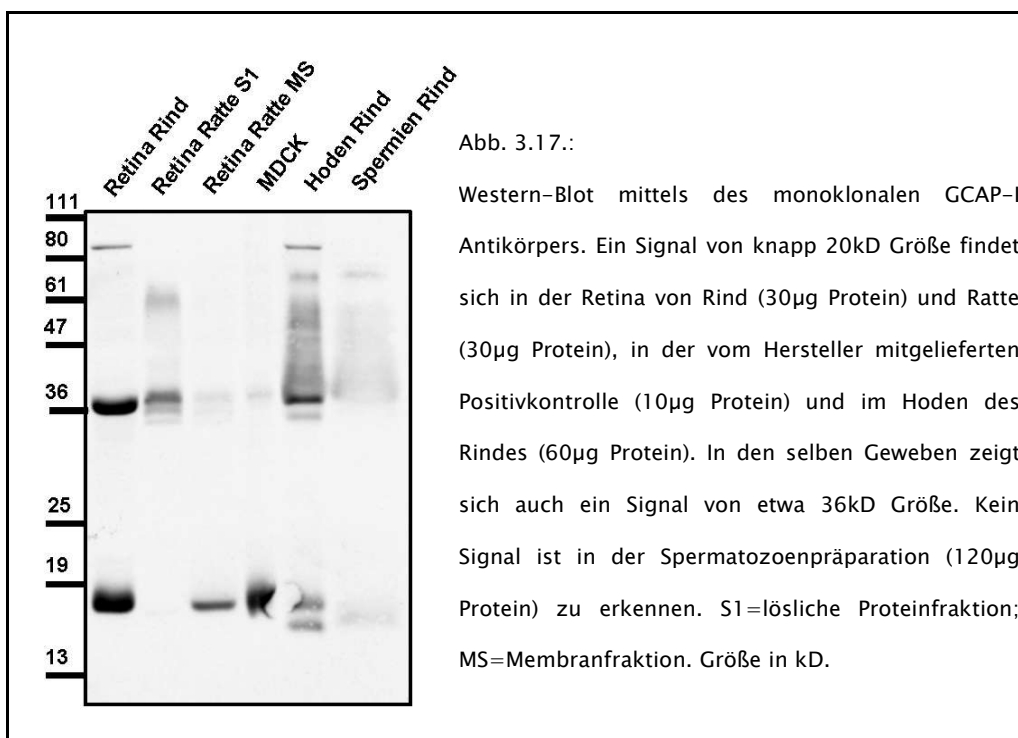
Auf diesen Befund hin wurde eine Reihe weiterer Gewebe untersucht und es fand sich in allen untersuchten Dünnschnitten eine hochselektive Anfärbung der kontraktile Elemente (Abb. 3.15. und 3.16.)



III.3.A.2. Western-Blot Untersuchungen

Als Positivkontrolle für den monoklonalen GCAP-1 Antikörper wurde von der Herstellerfirma ein MDCK-Zelllysate (Madin Darby Canine Kidney, Zelllinie aus der Niere eines Cockerspaniels; Information aus dem Datenblatt des Herstellers) mitgeliefert. Im Western-Blot zeigt sich an diesem Lysat –ebenso wie bei Verwendung eines Retinalysates– ein prominentes Signal von ca. 20kD Größe, also in der für GCAP zu erwartenden Größe (Abb. 3.17.). Ein solches Signal ist auch in Hodengewebe, nicht jedoch in einer Spermienpräparation detektierbar (Abb. 3.17.).

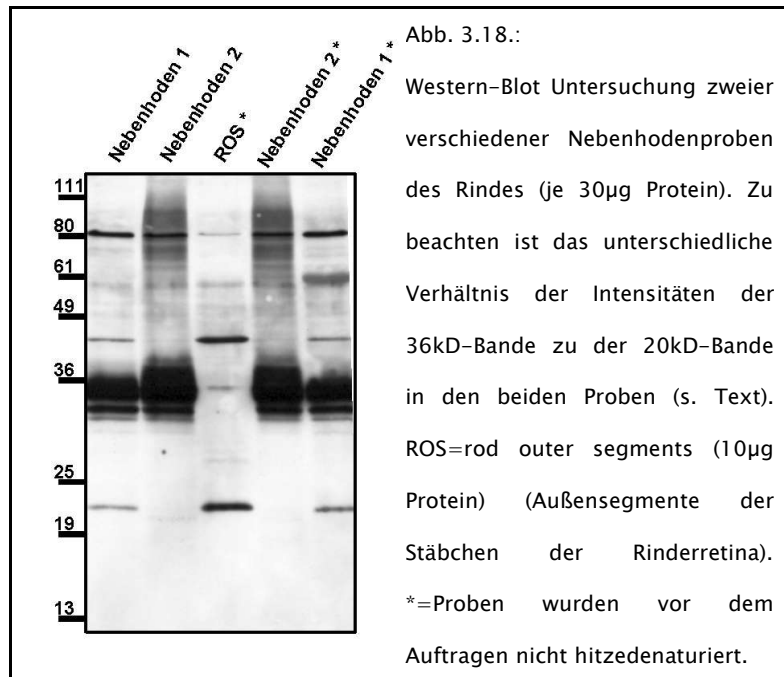
Zusätzlich zu der 20 kD-Bande findet sich in den genannten Geweben auch ein Signal von 36kD Größe, also ein Protein etwa der doppelten Masse.



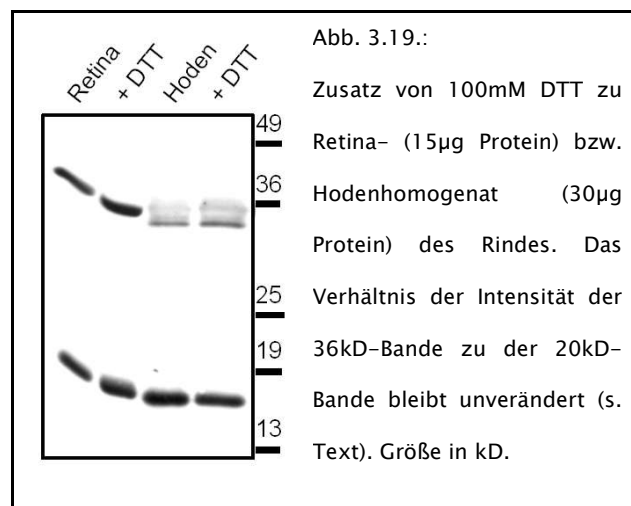
Aufgrund des Größenverhältnisses der beiden detektierten Banden ist das Vorliegen des GCAPs als Monomer und als Dimer in Betracht zu ziehen, in der Literatur ist die Möglichkeit der Dimerbildung für Guanylatcyclase aktivierende Proteine in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration beschrieben (Olshevskaya et al. 1999). Unterstützt wurde diese

Annahme durch das Ergebnis der Untersuchung verschiedener Nebenhodenproben (Abb. 3.18.). Hier zeigte sich in einer der Proben ein schwaches Signal bei ca. 20kd Größe, in einer anderen Probe war dieses Signal nicht erkennbar, dafür war das Signal bei etwa 36kd stärker ausgeprägt als in der ersten Probe. Eine Änderung des Intensitätsverhältnisses der beide Banden durch Auslassen der Hitzedenaturierung der Proben gelang jedoch nicht.

Um die Möglichkeit des Vorliegens eines GCAP-1 Dimers als Korrelat der 36kd-Bande weiter zu untersuchen, wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, deren Ziel es war, die Dimerisierung rückgängig zu machen und somit das Intensitätsverhältnis der

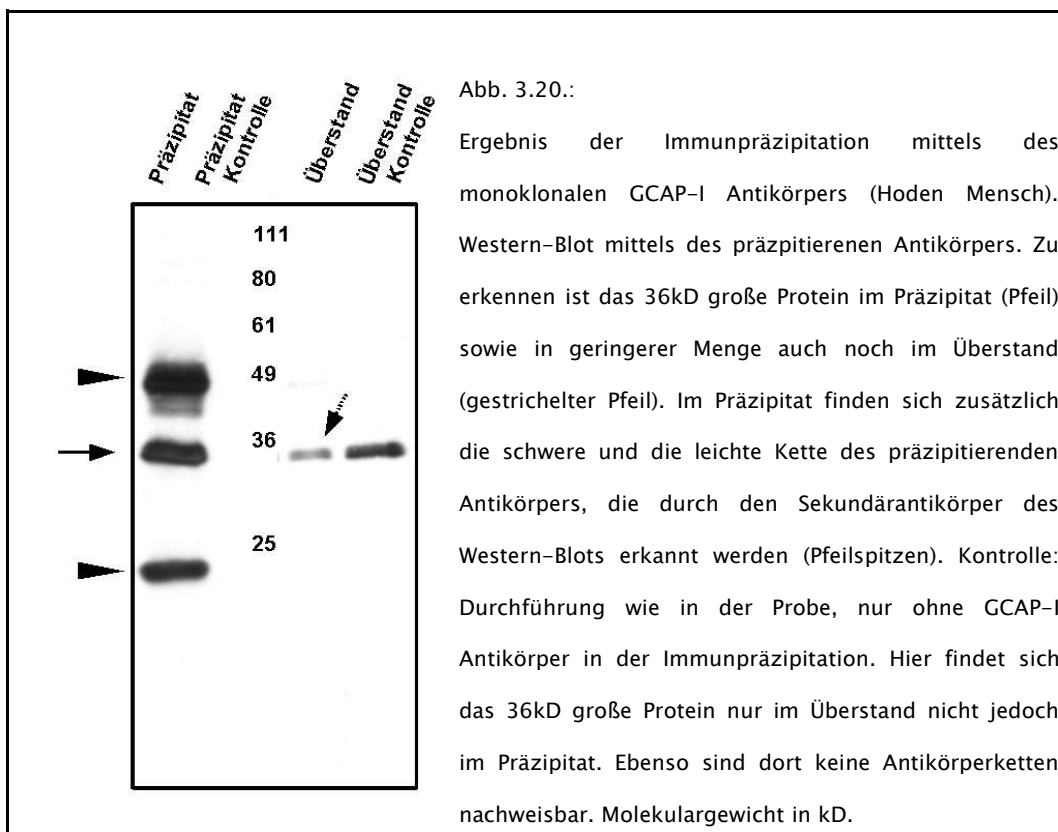


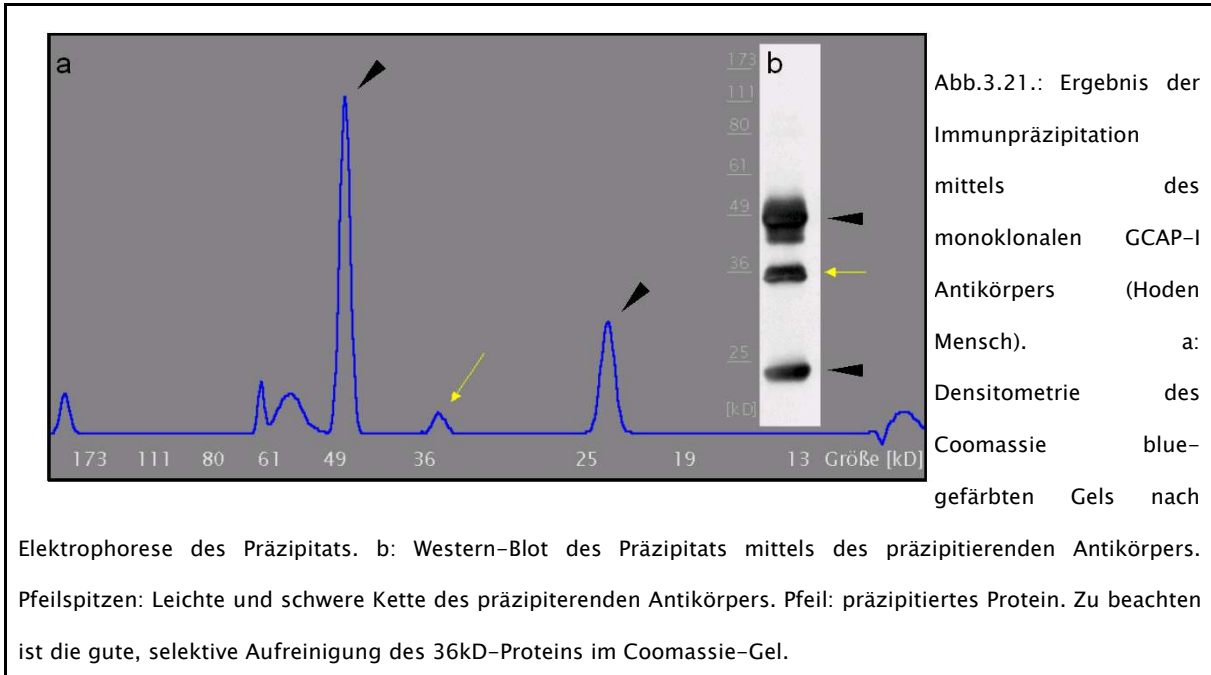
36kD-Bande zu der 20kD-Bande zu verändern. Neben dem Zusatz von 100mM DTT zu den Proben wurden Veränderungen der Denaturierungstemperatur (95°C, 40°C) und der Denaturierungsdauer (5,10,15 Minuten), der Zusatz von EGTA (5mM und 50mM), 2mM Ca²⁺ oder 10% β-Mercaptoethanol, die Alkalisierung der Probe durch NaOH sowie die Erhöhung der Molarität durch 300mM NaCl vorgenommen. Durch alle diese Maßnahmen war das erwähnte Intensitätsverhältnis der Banden nicht zu beeinflussen. Stellvertretend für diese Versuchsreihe ist in Abb. 3.19. das Ergebnis bei Zusatz von 100mM DTT wiedergegeben.



III.3.A.3 Isolierung des Proteins

Nachdem durch die oben genannten Ergebnisse das Vorliegen eines GCAP-Dimers unwahrscheinlicher geworden war und an andere Möglichkeiten wie etwa das Vorliegen einer bisher unbekanntem Splicevariante des Proteins oder auch einer Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem nicht verwandten Protein zu denken war, wurde eine Immunpräzipitation mittels Protein-G gekoppelter Agarose zur Isolierung des Proteins durchgeführt. Vorhergegangene Datenbankrecherchen haben keinen Hinweis auf eine ausgeprägte Ähnlichkeit der Peptidsequenz des verwendeten Antikörpers mit der Sequenz eines anderen Proteins ergeben. Das Ergebnis der Immunpräzipitation ist in Abb. 3.20 und in Abb. 3.21 dargestellt.





Wie zu erkennen ist, konnte mit Hilfe der Immunpräzipitation und der anschließenden Gelelektrophorese das 36kD große Protein erfolgreich aufgereinigt werden. Die entsprechende Bande wurde aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten und zur weiteren Analyse eingefroren. Eine Isolation des im GCAP-1 Western-Blot gefundenen 20kD großen Proteins war mit dieser Methode nicht möglich, da sich genau bei dieser Größe auch die leichte Kette des Antikörpers im Präzipitat findet.

Die Identität des isolierten 36kD-Proteins wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Buck, Institut für Zellbiochemie der Universität Hamburg, mittels ESI-Massenspektroskopie untersucht. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ließ sich die gefundene Aminosäuresequenz dem Zytoskelettprotein Tropomyosin zuordnen.

Dieses Protein besitzt eine zentrale Aufgabe im kontraktilem Apparat der Zelle (Perry 2001), womit sich die in der Immunhistochemie gefundene Färbung der glatten Muskulatur erklären lässt.

Die Identität des Proteins, das im Western-Blot die Bande bei ca. 20kD hervorruft, wird durch diese Ergebnisse nicht geklärt. Die ausgeprägte Kreuzreaktion des Antikörpers lässt ihn jedoch für weitere Versuche wenig geeignet erscheinen.

III.3.B. Untersuchungen mit dem polyklonalen GCAP-1 Antikörper

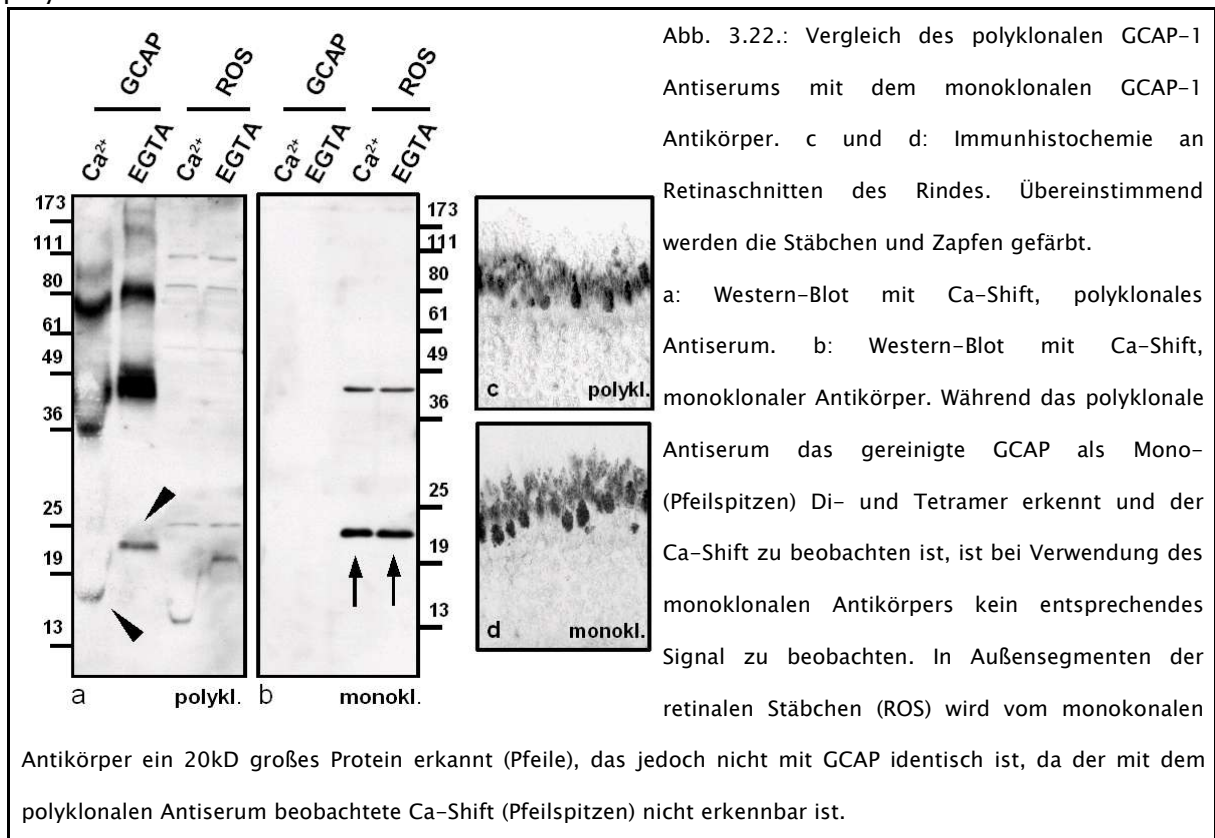
Nach diesen Ergebnissen wurden Untersuchungen mit einem anderen GCAP-1 Antikörper durchgeführt. Hierbei handelte es sich um ein polyklonales Antiserum, das gegen gereinigtes bovines GCAP (Frins et al. 1996) generiert wurde.

III.3.B.1. Vergleich der beiden GCAP-Antikörper

Mit diesem polyklonalen Antiserum wurden ebenfalls immunhistochemische Untersuchungen an Retinaschnitten des Rindes durchgeführt, hier kam es ebenso wie bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers zur Anfärbung der Stäbchen und Zapfen (Abb. 3.22 c und d).

Das Guanylatcyclase aktivierende Protein 1 gehört –wie in der Einleitung beschrieben– als Ca^{2+} -bindendes Protein in die Calmodulin-Superfamilie. Die Ca^{2+} -Bindung durch diese Proteine ist äußerst stabil, so dass sie sich im Western-Blot nachweisen lässt, da Ca^{2+} -gebundenes Protein ein scheinbar geringeres Molekulargewicht besitzt (Frins et al. 1996).

Abb. 3.22. a zeigt das Ergebnis eines solchen Ca-Shift Experimentes unter Verwendung des polyklonalen GCAP-Antiserums.



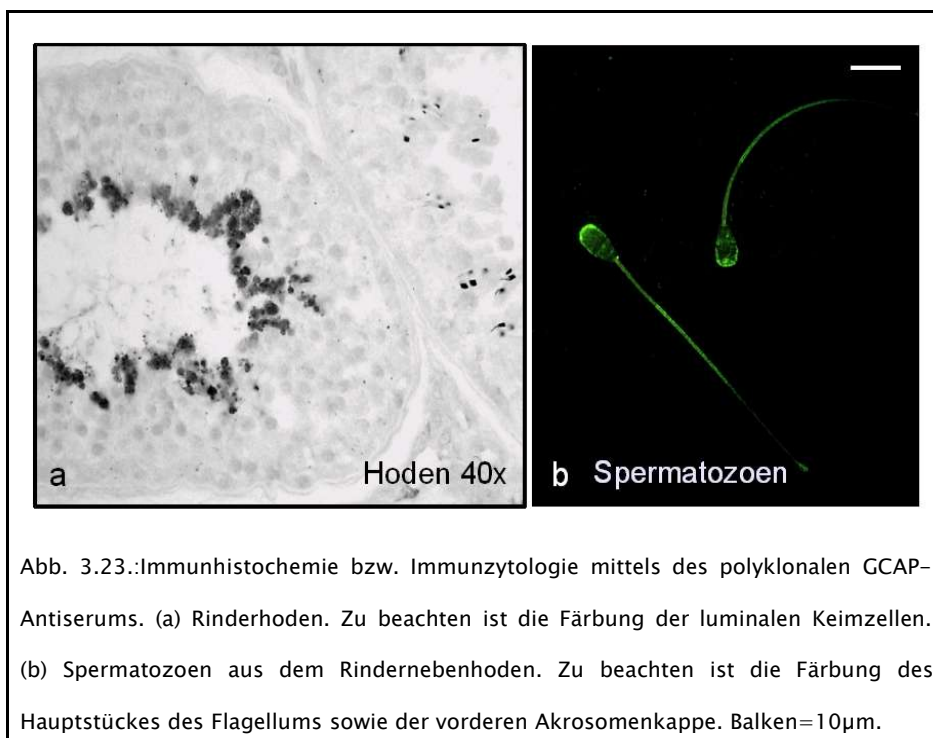
Für diesen Versuch stand gereinigtes GCAP zur Verfügung, zu erkennen ist deutlich die Veränderung des Laufverhaltens in Anwesenheit von 6mM Ca^{2+} bzw. von 15mM des Chelatbildners EGTA. Nebenbefundlich findet sich das Vorkommen von Di- und Tetrameren des GCAP, das weiter oben schon postuliert wurde. Diese Di- und Tetramere finden sich nicht bei Verwendung von Außensegmenten retinaler Stäbchen (ROS, Lambrecht et al. 1991), das Monomer mit dem charakteristischen Ca-Shift wird hier jedoch ebenfalls durch das polyklonale Antiserum erkannt.

Abb. 3.22. b zeigt den gleichen Versuch wie Abb. 3.22. a, jedoch unter Verwendung des monoklonalen GCAP-1 Antikörpers, der in den oben beschriebenen Versuchen eine ausgeprägte Kreuzreaktion mit dem 36kD großen Protein Tropomyosin zeigte. Dass die durch diesen Antikörper hervorgerufene 20kD große Bande (s.o.) ebenfalls nicht durch das Guanylatcyclase aktivierende Protein 1 hervorgerufen wird, wird nun deutlich:

Zum einen ist bei Verwendung des gereinigten GCAP kein Signal zu erkennen (Abb. 3.22 b) und zum anderen zeigt das in ROS detektierte Protein von 20kD Größe (Pfeile) nicht den zu erwartenden und mit dem polyklonalen Antiserum zu beobachtenden Ca-Shift.

III.3.B.2. Ergebnisse an Spermien

Da die GCAP-Spezifität des polyklonalen Antiserums nun nachgewiesen werden konnte (s. oben), wurden entsprechende Untersuchungen auch an männlichen Keimzellen des Rindes vorgenommen. An Schnitten des Rinderhodens zeigte sich eine positive Färbung der luminalen Keimzellen (Abb. 3.23.a) und an isolierten Spermatozoen aus dem Rindernebenhoden war eine Färbung des Hauptstückes des Flagellums sowie der vorderen Akrosomenkappe zu beobachten (Abb.3.23.b).



Zur weiteren Absicherung dieses Befundes wurden Western-Blot Untersuchungen an Spermatozoenpräparationen des Rindes mit dem polyklonalen Antiserum durchgeführt. Hierbei zeigte sich –wie bei der Anwesenheit von GCAP zu erwarten– ein deutliches Signal in der Größe von ca. 20kD. (Abb. 3.24.)

Gleichzeitig wurde der oben beschriebene Ca-Shift untersucht, um die Spezifität dieses Signals zu überprüfen. Hierbei zeigte sich nun ein deutlicher Unterschied zwischen der untersuchten Kontrolle (Außensegmente der retinalen Stäbchen des Rindes, ROS) und der Spermatozoenpräparation: In der Kontrolle war der Ca-Shift (Bei Verwendung von 20mM Ca²⁺ bzw. 20mM EGTA) klar zu erkennen (Abb. 3.24., Pfeilspitzen), während er in der

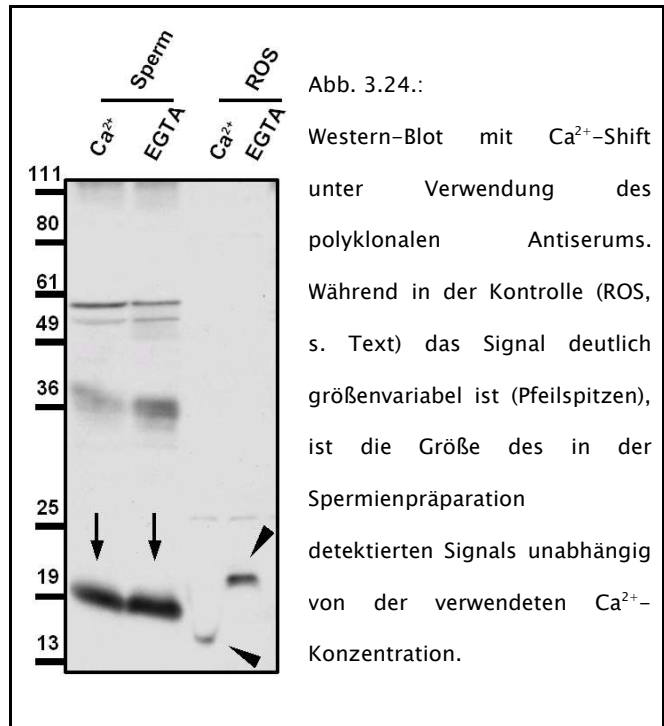


Abb. 3.24.: Western-Blot mit Ca²⁺-Shift unter Verwendung des polyklonalen Antiserums. Während in der Kontrolle (ROS, s. Text) das Signal deutlich größenvariabel ist (Pfeilspitzen), ist die Größe des in der Spermienpräparation detektierten Signals unabhängig von der verwendeten Ca²⁺-Konzentration.

Spermatozoenpräparation selbst bei diesen hohen Ionenkonzentrationen nicht nachzuweisen war (Abb. 3.24., Pfeile).

Dieses Ergebnis ließ nun begründete Zweifel an der GCAP-Spezifität des in Spermien beobachteten Signals aufkommen. Mittels Präabsorptionsuntersuchungen konnte anschließend nachgewiesen werden, dass das in Spermien detektierte Protein nicht identisch

mit dem in der Kontrolle (ROS) war (Abb. 3.25.): Während das in ROS zu beobachtende Signal (Abb. 3.25., Pfeil) nach Präabsorption des polyklonalen GCAP-Antiserums mit gereinigtem GCAP-1 ausgelöscht wird (Abb. 3.25., Pfeilspitze), bleibt das in

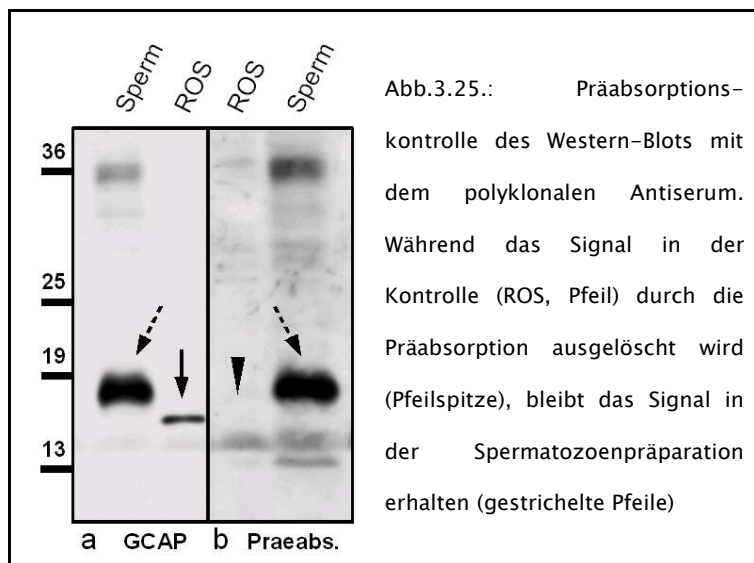


Abb.3.25.: Präabsorptionskontrolle des Western-Blots mit dem polyklonalen Antiserum. Während das Signal in der Kontrolle (ROS, Pfeil) durch die Präabsorption ausgelöscht wird (Pfeilspitze), bleibt das Signal in der Spermatozoenpräparation erhalten (gestrichelte Pfeile)

Spermien detektierte Signal auch nach der Präabsorption erhalten (Abb. 3.25., gestrichelte Pfeile).

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sind die Untersuchungen zum Vorkommen von drei cGMP-Signalwegskomponenten – der löslichen Guanylatcyclase sGC, der cGMP-abhängigen Proteinkinase I PKG I und des Guanylatcyclase aktivierenden Proteins 1 GCAP-1 – in Spermatozoen des Rindes beschrieben worden. Hierbei konnten mit der sGC und der PKG I zwei Proteine in Spermatozoen des Rindes nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen zum Vorkommen des aus der retinalen cGMP-Signaltransduktion bekannten Proteins GCAP-1 konnte in umfangreichen und methodisch bemerkenswerten Untersuchungen die Unbrauchbarkeit des verwendeten Antikörpers aufgedeckt werden.

IV.1. die sGC

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, mit der löslichen Guanylatcyclase (sGC, Koesling 1999) ein cGMP-produzierendes Enzym auf direkte Weise mittels Western-Blot und Immunzytochemie in Spermatozoen des Rindes nachzuweisen. Neben dem immunologisch-morphologischen Nachweis konnte die in-vivo Aktivität des Enzyms durch (i) Demonstration der NO-induzierten Motilitätssteigerung, (ii) der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des NO-induzierten cGMP-Anstiegs, (iii) der Inhibition dieses Prozesses durch den spezifischen sGC-Inhibitor ODQ sowie (iv) durch morphologische Demonstration des NO-induzierten cGMP-Anstiegs im Hauptstück des Flagellums und somit in unmittelbarer Nachbarschaft zu der sGC gezeigt werden.

Während im Western-Blot die β 1-Untereinheit des Enzyms in Spermatozoen des Rindes nachgewiesen werden konnte, zeigte sich im Falle der α 1-Untereinheit ein unspezifisches Signal in der Spermatozoenpräparation. Dieser Befund legt das Vorliegen des α 2 β 1-Holoenzym nahe, auch wenn das Vorkommen des α 1 β 1-sGC Holoenzym hierdurch nicht gänzlich auszuschließen ist, falls das unspezifische Signal ein schwaches spezifisches Signal

verdecken sollte.

Immunzytochemisch konnte die sGC und auch das von ihr produzierte cGMP im Hauptstück des Flagellums lokalisiert werden. Da in dieser Region auch ein cGMP-gesteuerter Ionenkanal gefunden wurde (Wiesner et al. 1998), erscheint er als ein wahrscheinliches Effektorprotein des durch die sGC produzierten cGMP. Dieser Ionenkanal wurde schon früher mit dem cGMP-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in Spermatozoen des Rindes in Verbindung gebracht (Wiesner et al. 1998). Die intrazelluläre Kalzium-Ionenkonzentration ist ein wichtiger Regulator der Spermienmotilität (Luconi et al. 2003), die potentielle Bedeutung des NO/cGMP-Systems für die Spermienmotilität erscheint hierdurch weiter unterstrichen. Stimulierende Effekte von NO auf die Motilität von Spermatozoen verschiedener Spezies sind in der Literatur beschrieben worden (Sengoku et al. 1998, Joo et al. 1999, Lewis et al. 1996, Zhang et al. 1996, Yeoman et al. 1998) und die eigenen Untersuchungen konnten dies auch für Spermatozoen des Rindes zeigen. Mit dem Nachweis der löslichen Guanylatcyclase erscheint es nun wahrscheinlich, dass diese NO-induzierten Effekte auf die Spermienmotilität tatsächlich durch den second messenger cGMP vermittelt werden.

Die hier gemachte Beobachtung, dass höhere Konzentrationen des NO-Donors SNP zwar zu einem weiteren Anstieg der cGMP-Produktion führen, jedoch ab einer bestimmten Höhe hemmend auf die Motilität wirken, dürfte auf die cGMP-unabhängige toxische Wirkung des Radikals NO zurückzuführen sein (eine Übersicht über die verschiedenen Wirkungen von NO findet sich in Bentz et al. 2000). Ein solcher biphasischer Effekt von NO auf die Spermienmotilität wurde früher bereits beim Menschen (Zhang et al. 1996) und bei der Elritze *Pimphelas promelas* (Creech et al. 1998) beschrieben.

Neben den CNG-Kanälen ist vor kurzem eine neue Ionenkanalfamilie in Spermatozoen beschrieben worden, diese so genannten CatSper-Kanäle sind durch Regulation der Hypermotilität unabdingbar für die männliche Fertilität (Carlson et al. 2003, Quill et al. 2003). Auch wenn diese Kanäle in ihrer Struktur kein cGMP-Bindungsmotiv besitzen, scheint ihre Funktion dennoch –über bisher ungeklärte Mechanismen– durch cAMP und alternativ durch cGMP beeinflusst zu werden (Ren et al. 2001).

Nach Abschluss der Versuche und während der Niederschreibung dieser Arbeit ist eine Veröffentlichung erschienen, in der vom Nachweis der sGC mittels Western-Blot sowie von Guanylatcyclase-Aktivitätsbestimmungen in Spermatozoen des Menschen berichtet wird (Willipinski-Stapelfeldt et al. 2004). Die Höhe der dort beim Menschen festgestellten cGMP-Konzentrationen im Bereich von $1-90\text{fmol}/10^6$ Spermienzellen liegt in der selben Größenordnung wie sie in der vorliegenden Arbeit bei Spermatozoen des Rindes gemessen wurden.

In der genannten Veröffentlichung (Willipinski-Stapelfeldt et al. 2004) wurde mittels radioaktiven ANP-Bindungsstudien der ANP-Rezeptor GC-A in Spermatozoen des Menschen demonstriert, ohne jedoch eine ANP-induzierte cGMP-Produktion nachweisen zu können. Beim Rind konnte in der vorliegenden sowie in verschiedenen älteren Arbeiten (Anderson et al. 1994, Zamir et al. 1995) ein solcher ANP-induzierter cGMP-Anstieg gezeigt werden. Diese Beobachtung mag entweder Speziesunterschiede in der Funktionalität der Guanylatcyclase A in Spermatozoen von Rind und Mensch reflektieren oder aber auf Unterschieden in der Sensitivität der verwendeten Messsysteme beruhen.

IV.2. die PKG I

Wie bereits in der Einführung dargestellt, ist die PKG I in den meisten somatischen Zellen als wichtigstes cGMP-Effektormolekül bekannt, während seine Existenz in Spermatozoen von Mammaliern bislang nicht stichhaltig nachgewiesen werden konnte.

Hier konnte das Protein nun in Spermatozoen des Rindes mittels Western-Blot, Immunzytochemie und nicht-radioaktiven cGMP-Bindungsstudien demonstriert werden.

Im Western-Blot zeigen zwei voneinander unabhängige Antikörper ein deutliches Signal in der Größe der PKG I. Ein Vergleich der Ergebnisse lässt zusätzlich Rückschlüsse auf die Verteilung der beiden bekannten Subtypen PKG I α und β in Spermatozoen und im Samenleiter zu: Die PKG I α und die PKG I β unterscheiden sich lediglich am N-terminalen Ende (Wernet et al. 1989), wobei der in dieser Arbeit verwendete N-terminale PKG-Antikörper gegen ein Peptid der PKG I α generiert wurde. Unter Verwendung des Subtypen-unselektiven PKG-CT Antikörpers erscheint das Western-Blot Signal im Samenleitergewebe deutlich stärker als das in den Spermien detektierte. Bei genauer Betrachtung ist die Zusammensetzung dieser starken Bande aus zwei Einzelbanden, also aus den beiden Subtypen α und β erkennbar.

Bei Verwendung des PKG I α -spezifischen NT-Antikörpers wird kein Intensitätsunterschied der Banden in den verschiedenen Geweben beobachtet. Somit kann man den Schluss ziehen, dass die PKG I α -Isoform im an glatter Muskulatur reichen Samenleiter die dominierende ist, während in Spermatozoen vor allem die β -Isoform zu finden ist.

Mit immunzytochemischen Methoden wurde die PKG I im Hauptstück des Flagellums von Rinderspermatozoen nachgewiesen, also in der gleichen Lokalisation wie auch das cGMP und die sGC als cGMP-Quelle. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass IP_3 -gesteuerte Ca^{2+} -Speicher an der Basis des Flagellums, also in relativer Nähe zu der PKG I, beschrieben wurden und diesen Ca^{2+} -Speichern eine Rolle bei der Regulation der Hypermotilität der Spermien zugeschrieben wird (Ho et al. 2003). Da der IP_3 -Rezeptor als ein wesentliches

Zielmolekül der PKG I bekannt ist (Carvajal et al. 2000), könnte das durch die sGC produzierte cGMP die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und somit die Motilität der Spermien durch Interaktion sowohl mit CNG-Kanälen als auch, vermittels der PKG I, mit IP_3 -Rezeptoren beeinflussen.

Neben dem Hauptstück des Flagellums stellt das Äquatoralsegment des Spermienkopfes eine weitere Region dar, in der die PKG immunzytochemisch lokalisiert wurde. In dieser Region wurde beim Menschen in Kollokalisierung mit dem Ca^{2+} -bindenden Protein Calreticulin ebenfalls der IP_3 -Rezeptor nachgewiesen (Naaby-Hansen et al. 2001), der eine wesentliche Rolle bei der Akrosomreaktion spielt (Walensky et al. 1995). Da die Phosphorylierung des IP_3 -Rezeptors durch die PKG in somatischen Zellen zu einer Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus den Speichern führt (Carvajal et al. 2000), wäre eine Hemmung der Akrosomreaktion durch den sGC-cGMP-PKG-Weg zu vermuten.

Andererseits jedoch gibt es Berichte, nach denen PKG-Inhibitoren die SNP-vermittelte Akrosomreaktion beim Menschen inhibieren (Revelli et al. 2001). Dieser Befund impliziert einen stimulierenden Effekt von cGMP/PKG auf die Ca^{2+} -Freisetzung, ein Prozess, der von Eizellen des Seeigels bekannt ist (Willmott et al. 1996), wo der Ca^{2+} -Ausstrom durch cADPR und Öffnung von RyR-like Ca^{2+} -Kanälen vermittelt werden soll.

Die durchgeführten nicht-radioaktiven cGMP-Bindungsstudien bestätigen nicht nur das Vorkommen der PKG in Spermatozoen des Rindes, sondern ermöglichen auch einen Vergleich der Mengen von cGMP- und cAMP-abhängiger Proteinkinase in Spermien und im an glatter Muskulatur reichen Samenleitergewebe. Ganz offensichtlich ist die Konzentration an PKG im Samenleiter wesentlich höher als in Spermien und in den Spermien wiederum ist die PKA deutlich dominierend gegenüber der PKG, da das durch die regulatorische Untereinheit der PKA hervorgerufene Signal wesentlich stärker ausgeprägt ist als das durch die PKG I hervorgerufene, obwohl das in der Untersuchung verwendete 8-Fluorescein-cGMP eine höhere Affinität zur PKG als zur PKA hat.

Es ist somit anzunehmen, dass das cGMP in den Spermien zu einem gewissen Grad auch die PKA in ihrer Funktion beeinflusst, die durch die Aktivierung des Kalziumeinstroms in die Zelle als ein Schlüsselenzym der Kapazitation und der Akrosomreaktion bekannt ist (Visconti et al. 1998, Visconti et al. 1999, Lefievre et al. 2002).

Die immunzytologisch beobachtete distinkte subzelluläre Lokalisation der PKG könnte in Analogie zu der PKA-Ankerproteinfamilie (AKAP-Familie, Baumann et al. 2002) ebenfalls durch eine Gruppe spezifischer Ankerproteine vermittelt sein. Verschiedene AKAPs wurden in Spermatozoen von Säugetieren nachgewiesen (Carr et al. 2001) und ein PKG-spezifisches Ankerprotein wurde in Spermatozoen-Vorläuferzellen der Maus identifiziert (Yuasa et al. 2000). Die außerordentliche Bedeutung der zellulären Mikroarchitektur für zyklisch-Nukleotid abhängige Signalwege wurde beispielsweise in Herzmuskelzellen neonataler Ratten demonstriert (Zaccolo et al. 2002), wo zeit- und ortsabhängige cAMP „Pools“ durch die Aktivität verschiedener Phosphodiesterasen aufrechterhalten werden.

Die regional sehr unterschiedliche intrazelluläre Konzentration der verschiedenen Botenstoffe schränkt die Aussagefähigkeit von Messungen an Ganzzellen oder deren Homogenaten deutlich ein, so dass mit der gefundenen deutlichen mengenmäßigen Dominanz der PKA gegenüber der PKG in Rinderspermien nicht zwangsweise auch eine gleichartige Verteilung der Bedeutung der verschiedenen Proteinkinasen für die Zellbiologie einher geht.

In der oben erwähnten jüngsten Veröffentlichung (Willipinski-Stapelfeldt et al. 2004) wurden solche vergleichende Messungen der cAMP- und der GMP-Spiegel an Spermatozoen des Menschen durchgeführt und es zeigte sich eine Dominanz des cAMP mit einer etwa 100-fach höheren Konzentration. Diese Ergebnisse deuten sich auch in dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Befund der gegenüber der PKG deutlich höheren Konzentration der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKA in Spermien des Rindes an. Bemerkenswerterweise konnte in der o.g. Arbeit (Willipinski-Stapelfeldt et al. 2004) die PKG im Gegensatz zur PKA in Spermatozoen des Menschen nicht nachgewiesen werden.

Auch in diesem Fall ist die Ursache entweder in unterschiedlichen Empfindlichkeiten der

verwendeten Messsysteme zu suchen oder aber die cGMP-abhängige Signaltransduktion verläuft in den männlichen Keimzellen der Spezies Rind und Mensch auf unterschiedlichen Wegen. Das Vorliegen verschiedener Signaltransduktionssysteme in verschiedenen Spezies erscheint als ein wirkungsvoller Mechanismus der Artbildung.

Bislang konnte das Vorkommen cGMP-abhängiger Signalwege in Spermatozoen von Mammaliern nur aufgrund der Ergebnisse verschiedener funktioneller Untersuchungen vermutet werden. Aufgrund der vielfältigen möglichen Quervernetzungen zwischen verschiedenen Signalwegen sind solche Ergebnisse jedoch nur bedingt verwertbar, wenn essentielle Daten über das Vorkommen der einzelnen beteiligten Proteine selbst fehlen. Nun ist es gelungen, mit der sGC eine wichtige cGMP-Quelle in Spermatozoen nachzuweisen und ihre subzelluläre Lokalisation aufzudecken. Mit der PKG I konnte des Weiteren ein bekanntes cGMP-Effektormolekül nachgewiesen und ebenfalls in der Zelle lokalisiert werden. Somit wurde eine wertvolle, wenn nicht gar notwendige Basis geschaffen, um die sicher komplexe Rolle des Botenstoffes cGMP in Spermatozoen auch von Säugetieren weiter zu verstehen.

IV.3. Die Untersuchungen zu Komponenten des retinalen cGMP-Weges

Ausgehend von der früheren Beschreibung eines cGMP-gesteuerten Ionenkanals in Spermatozoen des Rindes (Wiesner et al. 1998), dessen Rolle und dessen molekulare Steuerung durch ein spezifisches Signalsystem in den retinalen Sinneszellen gut verstanden ist, wurde in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen weiterer Komponenten des retinalen Signalweges in Spermatozoen untersucht.

Während die Überlegung, bislang als typisch retinal lokalisiert beschriebene Proteine auch in Spermatozoen zu vermuten, auf den ersten Blick überraschend erscheinen mag, so gibt es doch einige Gemeinsamkeiten zwischen diesen beiden Zelltypen. Sowohl die retinalen Sinneszellen als auch die männlichen Keimzellen im Hoden sind in ein hochspezialisiertes Stützgewebe aus Pigmentepithel- bzw. Sertolizellen eingebettet, das über die Ausbildung der Blut-Retina- bzw. der Blut-Hoden-Schranke für ein spezifisches Milieu sorgt. So wurde bei Mäusen mit einem Defekt eines ubiquitär exprimierten Chloridkanals die Degeneration von retinalen Sinneszellen und männlichen Keimzellen beschrieben (Bösl et al. 2001). Auf morphologischer Ebene ist in diesem Zusammenhang auf das kurze, zilienähnliche Segment in den retinalen Sinneszellen hinzuweisen, das das Innensegment mit dem Außensegment verbindet und dessen Funktion oder Herkunft bislang nicht geklärt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen des Guanylatcyclase aktivierenden Proteins 1 (GCAP-1) untersucht, das in der Retina für die Regulation der cGMP-Produktion durch die retinalen Guanylatcyclasen (ret GC) verantwortlich ist.

Der unerwartete immunhistochemische Befund der selektiven Färbung kontraktile Zellen bei GCAP-charakteristischer Färbung retinaler Sinneszellen war unter Berücksichtigung der Funktion des Proteins in der Retina von großen Interesse:

In den glatten Muskelzellen ist Ca^{2+} bekanntermaßen ein essentieller Regulator der Kontraktion und cGMP ist als wesentlicher relaxierender Faktor in diesen Zellen bekannt

(Carvajal et al. 2000). Das GCAP stellt in der Retina einen Vermittler genau zwischen diesen beiden Faktoren her, indem es die Guanylatcyclaseaktivität in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration reguliert. Das Vorkommen dieses Proteins in glatten Muskelzellen wäre somit von potentiell großer Bedeutung gewesen, was zu der detaillierten Abklärung dieses Nebenbefundes geführt hat.

Auch wenn der Nachweis der Expression des GCAP-1 in Spermatozoen des Rindes in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen ist, ist hierdurch das Vorkommen der retGC in diesen Zellen nicht ausgeschlossen. So wird die Aktivität dieses Enzyms durch weitere, hier nicht untersuchte GCAP-Isoformen sowie weitere kalziumbindende Proteine wie S100 reguliert (Schrem et al. 1999, Kachi et al. 1999, Haeseleer et al. 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch hier nicht dargestellte Untersuchungen zum Vorkommen der retGC selbst in Spermatozoen des Rindes vorgenommen. Aufgrund methodischer Schwierigkeiten mit den zur Verfügung stehenden Antiseren ließen die bisherigen Ergebnisse jedoch keine Aussage zu.

Neben dem CNG-Kanal konnte mit der Phosphodiesterase 6 zumindest eine weitere bisher als typisch retinal bekannte cGMP-Signalwegskomponente in Spermatozoen des Rindes nachgewiesen werden (Dissertation A. Mietens, persönliche Mitteilung).

Ein Aspekt der Untersuchungen zu der Expression des GCAP 1 in Spermatozoen des Rindes sei an dieser Stelle noch einmal ausführlicher dargestellt: Die Frage nach der Spezifität eines beobachteten Signals. Bei erwartetem Ausfall der Positivkontrolle in der Immunhistochemie und dem gesuchten Protein entsprechender Größe eines deutlichen Signals im Western Blot ist es erst durch die Proteinisolierung und anschließende Massenspektrometrie gelungen, die Identität des im Western-Blot detektierten Proteins zu klären und die Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem Zytoskelettprotein Tropomyosin aufzudecken.

IV.3. Die Untersuchungen zu Komponenten des retinalen cGMP-Weges

Vergleicht man die Aminosäuresequenz von GCAP 1 mit der Aminosäuresequenz von Tropomyosin 1, so erhält man mit Hilfe der BLAST Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) eine relative Übereinstimmung in einem Bereich von 14 Aminosäuren:

```
45 LKNLSPSASQYVEQ 58 (GCAP 1)
    LK+L + A +Y ++
204 LKSLEAQAEKYSQK 217 (Tropomyosin 1)

Verwendete Parameter (BLAST 2 Sequences):
Matrix: PAM250; gap open: 14; gap extension: 2;
x_dropoff: 50; expect: 1000000; wordsize: 3; Filter: yes
```

Es ist also zu vermuten, dass das die Kreuzreaktion hervorrufende Epitop in diesem Abschnitt zu suchen ist.

Da vor Durchführung der Proteinisolierung bereits an die potentielle Möglichkeit einer Kreuzreaktion des Antikörpers gedacht wurde, wurde mit Hilfe der BLAST-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) nach Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz des zur Generierung des GCAP 1-Antikörpers verwendeten Peptides mit anderen Proteinen gesucht. Hierbei ergaben sich lokale Ähnlichkeiten zu einer ganzen Reihe von Proteinen, die sich untereinander im Grad ihrer Übereinstimmung jedoch nicht wesentlich unterschieden. Exemplarisch sei hier die lokale Übereinstimmung der GCAP 1-Peptidsequenz mit der Sequenz einer Untereinheit des T-Zell Rezeptors dargestellt:

```
3 QFFGLKNLSPWASQYVE 19 (GCAP 1 Peptid)
  QFFGL S W + Y E
46 QFFGLCASSAWGANYAE 62 (T-Zell Rez. β-Kette CDR3)
```

Die Verwendung von Aminosäuresequenzvergleichen ist zur Vorhersage von Kreuzreaktionen also nur sehr eingeschränkt verwendbar, da zum einen ein Epitop in der Regel nur aus wenigen Aminosäuren besteht und somit sehr viele „Treffer“ der Datenbankrecherche als potentielle Kreuzreaktanden in Frage kommen und zum anderen für

die Kreuzreaktion die räumliche Struktur des Epitops die entscheidende Rolle spielt und der Sequenzvergleich nur bedingt Rückschlüsse auf die räumliche Ähnlichkeit der gefundenen Sequenzen zulässt. Wie in dem gezeigten Beispiel kann häufig eine Kreuzreaktion nicht mit Hilfe dieser Methode vorausgesagt werden, jedoch kann bei bekanntem Kreuzreaktionspartner im Nachhinein die Aminosäuresequenz gefunden werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die Kreuzreaktion bewirkt.

Im Anschluss an die Untersuchungen mit dem monoklonalen GCAP 1-Antikörper wurden Untersuchungen mit einem zweiten, polyklonalen, GCAP 1-Antikörper durchgeführt. In vergleichenden Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass der monoklonale Antikörper nicht nur eine Kreuzreaktion zeigte, sondern auch nicht in der Lage war, GCAP-1 zu detektieren.

Diese Befunde können als Beispiel dafür dienen, wie bedeutend eine kritische Hinterfragung auch anscheinend plausibler Daten durch die Verwendung mindestens einer weiteren, unabhängigen Methode ist. Deutlich wurde auch die Stärke der Massenspektroskopie für diese Aufgabe: Mittels immunologischer Techniken ist es nur möglich, das Vorhandensein eines bestimmten gesuchten Proteins zu überprüfen, also in Abhängigkeit einer vorher gefassten Theorie. Die Massenspektroskopie hingegen ermöglicht es, ein zuvor isoliertes Protein unabhängig von einer a priori gefassten Annahme zu identifizieren. Bei einer solchen Kontrolle ist die Fehlerwahrscheinlichkeit durch subjektive Faktoren geringer.

Jedoch ist der Einsatz dieser Methode beschränkt auf die Fälle, in den es möglich ist, das Protein zu isolieren, in den anderen Fällen können verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. In der vorliegenden Arbeit waren dies beispielsweise die Kontrolle durch Präabsorption mit vorhandenen Peptiden oder Proteinen sowie der Nachweis der Enzymaktivität im Falle der sGC, die Verwendung mehrerer voneinander unabhängiger Antikörper sowie des Nachweises spezifischer Ligandenbindungen im Falle der PKG I sowie die Präabsorption und der Nachweis des Ca^{2+} -Shifts im Falle des GCAP.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Während die Rolle des Botenstoffes zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) für die Biologie von Spermatozoen mariner Invertebraten wie dem Seeigel *Strongylocentrotus purpurea* sehr gut bekannt ist, sind die Erkenntnisse über die Bedeutung cGMP-abhängiger Signalwege und das Vorhandensein von cGMP-produzierenden Guanylatcyclasen und von cGMP-bindenden Effektormolekülen in Spermatozoen der Säugetiere bislang nur fragmentarisch.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, (i) das Vorhandensein des NO-Rezeptors lösliche Guanylatcyclase (sGC) und der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (PKG I) in Rinderspermatozoen nachzuweisen, (ii) die funktionelle Aktivität der sGC in vivo durch cGMP-Konzentrationsbestimmungen und Nachweis NO-abhängiger Motilitätszunahme zu demonstrieren und (iii) die subzelluläre Lokalisation dieser beiden cGMP-Signalwegskomponenten aufzudecken: Sowohl die sGC als auch die PKG I finden sich im Hauptstück des Flagellums und die PKG I ist zusätzlich im Äquatoralsegment des Spermienkopfes zu finden.

Nachdem ein aus dem retinalen cGMP-System bekannter Ionenkanal (CNG-Kanal) in Rinderspermatozoen demonstriert wurde, wurde das Vorkommen weiterer Komponenten des retinalen cGMP-Systems untersucht, so auch des Aktivatorproteins (GCAP) der retinalen Guanylatcyclase. Bei diesen Versuchen zeigte sich die eminente Bedeutung von unabhängigen Kontrollen der Spezifität von beobachteten Signalen, nachdem die Kreuzreaktion des verwendeten Antikörpers mit einem Protein des selben Molekulargewichtes erst durch die Kombination von Immunpräzipitation und Massenspektrometrie aufgedeckt werden konnte.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bilden eine wertvolle Grundlage für das weitere Verständnis der komplexen Rolle cGMP-abhängiger Signalwege in Spermatozoen der Säugetiere, da die Ergebnisse funktioneller Untersuchungen nur dann sinnvoll zu interpretieren sind, wenn essentielle Daten über das Vorkommen in Frage kommender Interaktionspartner in der Zelle vorhanden sind.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Anderson RA, Feathergill KA, Drisdell RC, Rawlins RG, Mack SR, Zaneveld LJ (1994) Atrial natriuretic peptide (ANP) as a stimulus of the human acrosome reaction and a component of ovarian follicular fluid: correlation of follicular ANP content with in vitro fertilization outcome. *J Androl* 15: 61–70

Bauman AL, Scott JD (2002) Kinase- and phosphatase-anchoring proteins: harnessing the dynamic duo. *Nat Cell Biol* 4: E203–206

Bentz BG, Simmons RL, Haines GK, Radosevich JA (2000) The yin and yang of nitric oxide: reflections on the physiology and pathophysiology of NO. *Head Neck* 22: 71–83

Bösl MR, Stein V, Hübner C, Zdebik AA, Jordt SE, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Holstein AF, Jentsch TJ (2001) Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl⁻ channel disruption. *EMBO J* 20: 1–11

Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF (2003) CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14864–14868

Carr DW, Fujita A, Stentz CL, Liberty GA, Olson GE, Narumiya S (2001) Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA. *J Biol Chem* 276: 17332–8

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 184: 409–420

Cook SP, Brokaw CJ, Muller CH, Babcock DF (1994) Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev Biol* 165: 10–19

Creech MM, Arnold EV, Boyle B, Muzinich MC, Montville C, Bohle DS, Atherton RW (1998) Sperm motility enhancement by nitric oxide produced by the oocytes of fathead minnows, *Pimephelas promelas*. *J Androl* 19: 667–74

Cvek K, Ridderstrale Y, Gerstberger R (1998) Functional receptors for atrial natriuretic peptide in the rat mammary gland during lactation. *Endocrinology* 139: 2615–2621

Davidoff MS, Schulze W, Middendorff R, Holstein AF (1993) The Leydig cells of the human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tis Res* 271: 429–439

Davidoff MS, Middendorff R (2000) The nitric oxide system in the urogenital tract. In: Steinbusch HWM, De Vente J, Vincent SR (eds.) *Handbook of chemical neuroanatomy*, vol. 17. Elsevier, Amsterdam, pp 267–314

Dizhoor AM, Huley JB (1999) Regulation of photoreceptor membrane guanyl cyclases by guanyl cyclase activator proteins. *Methods* 19: 521–531

Eisenbach M (1999) Sperm chemotaxis. *Rev Reprod* 4: 56–66

Foss KB, Landmark B, Skalhegg BS, Tasken K, Jellum E, Hansson V, Jahnsen T (1994) Characterization of in-vitro-translated human regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinases. *Eur J Biochem* 220: 217–223

Friebe A, Koesling D (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanyl cyclase. *Circ Res* 93:

96–105

Frins S, Bonigk W, Müller F, Kellner R, Koch KW (1996) Functional characterization of a guanylyl cyclase-activating protein from vertebrate rods. Cloning, heterologous expression, and localization. *J Biol Chem* 271: 8022–8027

Galindo BE, Beltrán C, Cragoe EJ, Darszon A (2000) Participation of a K⁺ channel modulated directly by cGMP in the speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Dev Biol* 221: 285–294

Haseleer F, Sokal I, Li N, Pettenati M, Rao N, Bronson D, Wechter R, Baehr W, Palczewski K (1999) Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily. *J Biol Chem* 274: 6526–6535

Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C (2003) Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Curr Pharm Des* 9: 419–25

Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C (1999) Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol Reprod* 61: 575–581

Ho HC, Suarez SS (2003) Characterisation of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68: 1590–1596

Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 113: 1671–1676

Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J (2002) Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide. *Circ Res* 90: 21–28

Ikura M (1996) Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *TIBS* 21: 14–17

Joo BS, Park SH, Park SJ, Kang HS, Moon HS, Kim HD (1999) The effect of nitric oxide on sperm cell function and embryo development. *Am J Reprod Immunol* 42: 327–334

Kachi s, Nishizawa Y, Olshevskaya E, Yamazaki A, Miyake Y, Wakabayashi T, Dizhoor A, Usukura J (1999) Detailed localiation of photoreceptor guanylate cyclase activating protein-1 and -2 in mammalian retinas using light and electron microscopy. *Exp Eye Res* 68: 465–473

Kaupp UB (1994) Am Anfang des Sehens. In: *Mannheimer Form 94/95*, Boehringer Mannheim

Kaupp UB, Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* 82: 769–824

Kaupp UB, Solzin J, Hildebrand E, Brown JE, Helbig A, Hagen V, Beyermann M, Pampaloni F, Weyand I (2003) The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat Cell Biol* 5: 109–117

Kobori H, Miyazaki S, Kuwabara Y (2000) Characterization of intracellular Ca^{2+} -increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 63: 113–120

Koch KW, Stecher P, Kellner R (1994) Bovine retinal rod guanyl cyclase represents a new N-glycosylated subtype of membrane-bound guanyl cyclases. *Eur J Biochem* 222: 589–595

Koesling D (1999) Studying the structure and regulation of soluble guanyl cyclase. *Methods* 19: 485–493

Koglin M, Behrends S (2003) A functional domain of the $\alpha 1$ subunit of soluble guanyl cyclase is necessary for activation of the enzyme by nitric oxide and YC-1 but is not involved in heme binding. *J Biol Chem* 278: 12590–12597

Krstic RV (1991) *Human microscopic anatomy*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Kuo RC, Baxter GT, Thompson SH, Stricker SA, Patton C, Bonaventura J, Epel D (2000) NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature* 406: 633–636

Lambrecht HG, Koch KW (1991) A 26kD calcium binding protein from bovine rod outer segments as modulator of photoreceptor guanylate cyclase. *EMBO J* 10: 793–798

Lefievre L, Jha KN, de Lamirande E, Visconti PE, Gagnon C (2002) Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *J Androl* 23: 709–716

Lewis SEM, Donnelly ET, Sterling ESL, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U (1996) Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod* 2: 873–878

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldmann SA (2000) Guanyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52: 375–413

Luconi M, Baldi E (2003) How do sperm swim? Molecular mechanism underlying sperm motility. *Cell Mol Biol* 49: 357–369

Lugnier C, Keravis T, Eckly-Michel A (1999) Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. *J Physiol Pharm*

50: 639–652

Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. (2003) Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res.* 39:67–86

Middendorff R, Müller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF, Davidoff MS (2002) The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cGMP. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3486–3499

Müller D, Middendorff R, Olcese J, Mukhopadhyay (2002) Central nervous system-specific glycosylation of the type A natriuretic peptide receptor. *Endocrinology* 143: 23–29

Müller D, Mukhopadhyay AK, Speth RC, Guidone G, Potthast R, Potter LR, Middendorff R (2004) Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis. *Endocrinology* 145: 1392–1401

Naaby-Hansen S, Wolkowicz MJ, Klotz K, Bush LA, Westbrook VA, Shibahara H, Shetty J, Coonrod SA, Reddi PP, Shannon J, Kinter M, Sherman NE, Fox J, Flickinger CJ, Herr JC (2001) Co-localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and calreticulin in the equatorial segment and in membrane bounded vesicles in the cytoplasmic droplet of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 7: 923–933

Olshevskaya EV, Ermilov AN, Dihor AM (1999) Dimerization of guanyl cyclase-activating protein and a mechanism of photoreceptor guanyl cyclase activation. *J Biol Chem* 274: 25583–25587

Perry SV (2001) Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 22:5–49

Quill AT, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL (2003) Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14869–14874

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

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

Revelli A, Costamagna C, Moffa F, Aldieri E, Ochetti S, Bosia A, Massobrio M, Lindblom B, Ghigo D (2001) Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Reprod* 64:1708–1712

Revelli A, Ghigo D, Moffa F, Massobrio M, Tur-Kaspa I (2002) Guanylate cyclase activity and sperm function. *Endocr Rev* 23(4): 484–494

Schrem A, Lange C, Beyermann M, Koch KW (1999) Identification of a domain in guanylyl cyclase-activating protein 1 that interacts with a complex of guanyl cyclase and tubulin in photoreceptors. *J Biol Chem* 274: 6244–6249

Sengoku K, Tamate K, Yoshida T, Takaoka Y, Miyamoto T, Ishikawa M (1998) Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil Steril* 69: 522–527

Subbaraya I, Ruiz CC, Helekar BS, Zhao X, Gorczyca WA, Pettenai MJ, Rao PN, Palczewski K, Baehr W (1994) Molecular characterization of human and mouse photoreceptor guanylate

cyclase-activating protein (GCAP) and chromosomal localiation of the human gene. *J Biol Chem* 269: 31080–31089

Tanaka J, Markering-van Ittersum M, Steinbusch HW, De Vente J (1997) Nitric oxide-mediated cGMP synthesis in oligodendrocytes in the developing rat brain. *Glia* 19: 286–97

Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P (2002) Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanyl cyclases. *Mol Cell Biochem* 230: 31–47

Vaandrager AB, Hogema BM, Edixhoven M, van den Burg CM, Bot AG, Klatt P, Ruth P, Hofmann F, Van Damme J, Vandekerckhove J, de Jonge HR (2003) Autophosphorylation of cGMP-dependent protein kinase type II. *J Biol Chem* 278: 28651–28658

De Vente J, Steinbusch HW (1993) Immunocytochemistry of second messenger moecules: the study of formaldehyde-fixed cyclic GMP. In: Cuello AC (Ed.) *Immunohistochemistry II*. John Wiley & Sons. 409–427

Visconti PE, Kopf GS (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59: 1–6

Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezon JG (1999) Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* 61: 76–84

Walensky LD, Snyder SH (1995) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localised to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* 130: 857–869

Wedel BJ, Garbers DL (2001) The guanyl cyclase family at Y2K. *Annu Rev Physiol* 63: 215–233

Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. FEBS Lett 251: 191–196

Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I (1998) Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} -entry in sperm. J Cell Biol 142: 473–484

Willipinski-Stapelfeldt B, Lübberstedt J, Stelter S, Vogt K, Mukhopadhyay AK, Müller D (2004) Comparative analysis between cyclic GMP and cyclic AMP signaling in human sperm. Mol Hum Reprod 10: 543–552

Willmott N, Sethi JK, Walseth TF, Lee HC, White AM, Galione A (1996) Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. J Biol Chem 271: 3699–3705

Yeoman RR, Jones WD, Rizk BM (1998) Evidence for nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. J Androl 19: 58–64

Yuasa K, Omori K, Yanaka N (2000) Binding and phosphorylation of a novel male germ cell-specific cGMP-dependent protein kinase-anchoring protein by cGMP-dependent protein kinase I α . J Biol Chem 275: 4897–4905

Zaccolo M, Pozzan T (2002) Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. Science 295: 1711–1715

Zamir N, Barkan D, Keynan N, Naor Z, Breitbart H (1995) Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. Am J Physiol 269: E216–E221

Zhang H, Zheng RL (1996) Possible role of nitric oxide on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm functions. *Free Radic Res* 25: 347–354

Folgende Kurzfassungen von Vorträgen sind aus der vorliegenden Arbeit bisher erschienen:

Middendorff R, Borchert O, Mietens A, Buck F, Weyand I, Müller D (2002) Retina-specific cGMP-pathways in extraretinal tissues? A critical investigation. *Annals of Anatomy*, 184 (suppl.): 176

Borchert O, Müller D, Buck F, Weyand I, Middendorff R (2002) Oh antigen, who art thou? Problems in immunodetection. *Annals of Anatomy*, 184: 105–112

VII. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Ralf Middendorff für die Überlassung des Themas sowie die sehr gute stetige Betreuung der Arbeit und Marco Mewe für die regelmäßige Beschaffung des Rindermaterials. Frau Salewski möchte ich stellvertretend für alle Technischen Assistentinnen des Anatomischen Instituts danken, die stets ein offenes Ohr für die zahllosen großen und kleinen technischen Fragen hatten. Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Anatomischen Institutes bedanke ich mich für die nette Atmosphäre, die die Arbeit im Institut unabhängig von Erfolg oder Misserfolg der Versuche zu einer Zeit werden ließen, an die ich gerne zurückdenke.

Fritz Buck vom Institut für Zellbiologie möchte ich für die Bestimmung des isolierten Proteins durch die ESI-Massenspektroskopie herzlich danken, die zwar nicht das erhoffte Resultat gebracht hat, aber einen wesentlichen Impuls für kritische Überprüfung aller erlangten Daten gebracht hat.

Dieter Müller und Jörn Lübberstedt vom Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung Hamburg danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung und kritische unabhängige Beratung sowie die Bereitstellung von Proteinproben.

Ingo Weyand vom Forschungszentrum Jülich sowie Sönke Behrends vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Universität Hamburg danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern, Peptiden sowie Kontrollproteinen.

Bei dem Graduiertenkolleg 336 bedanke ich mich für die finanzielle und inhaltliche Unterstützung des Projektes.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die geholfen haben, die mit der Laborarbeit verbundenen Stimmungsschwankungen auszugleichen.

LEBENS LAUF

Oliver Borchert

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 7. Oktober 1977 in Hamburg
Nationalität: deutsch



Schul- und Hochschulausbildung

20.6.1997 Abitur
10/1997–9/1999 Vorklinisches Studium an der Universität Hamburg
23.9.1999 Ärztliche Vorprüfung
10/1999–6/2004 Klinisches Studium an der Universität Hamburg
2.6.2004 Ärztliche Prüfung

Famulaturen

- in der kardiologischen Abteilung des Donauspitals in Wien
- in der anästhesiologischen Abteilung der Universitätsklinik Kuopio, Finnland
- in der Notaufnahme des Letterkenny General Hospital, Irland
- und im Institut für Anatomie der Universität Hamburg, an dem diese Arbeit entstanden ist

Praktisches Jahr

- Chirurgie: Universitätsklinik Kuopio, Finnland
- Innere Medizin: Ev. Amalie-Sieveking-Krankenhaus, Hamburg
- Kinder- und Jugendmedizin: Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Wissenschaft

- Beginn der Tätigkeit als Doktorand am Institut für Anatomie der Universität Hamburg bei Herrn PD Dr. Ralf Middendorff am 1.7.2000
- Während der Arbeit Mitglied im Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie-Molekularer Stoffwechsel“ der Universität Hamburg, hierbei für insgesamt neun Monate als Stipendiat gefördert

Hamburg, den 30. August 2004

ERKLÄRUNG

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung der Promotion beworben habe.

Hamburg, den 30.August 2004