

Die Induktion der Akrosomreaktion im bovinen System unter  
Verwendung der physiologischen Induktoren Progesteron und  
synthetischer ZP3 Peptide

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hedrich, Friedemann  
aus Gießen

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie  
Hautklinik

Abteilung Allgemeine Dermatologie und Andrologie  
Leiter: Prof. Dr. med. Schill  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med Hinsch  
Gutachter: PD. Dr. med Zygmunt

Tag der Disputation: 10.03.2003

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	GRUNDLAGEN DER BEFRUCHTUNG .....	1
1.2	DIE SPERMATOZOENMORPHOLOGIE.....	2
1.2.1	<i>Der Spermatozoenkopf.....</i>	2
1.2.1.1	Die Plasmamembran.....	2
1.2.1.2	Das Akrosom .....	2
1.2.1.3	Der Zellkern.....	4
1.2.2	<i>Der Spermatozoenschwanz.....</i>	4
1.2.2.1	Das Verbindungsstück.....	4
1.2.2.2	Das Mittelstück .....	5
1.2.2.3	Das Hauptstück.....	5
1.2.2.4	Das Endstück.....	5
1.3	SPERMATOZOENFUNKTION.....	7
1.3.1	<i>Kapazitation.....</i>	7
1.3.2	<i>Akrosomreaktion .....</i>	9
1.4	EIZELLE.....	14
1.4.1	<i>Zona pellucida.....</i>	14
1.4.1.1	Das Zona Pellucida 3-Protein.....	15
1.5	HETEROTRIMERE G-PROTEINE.....	17
1.6	KRYOKONSERVIERUNG.....	19
1.7	KLINISCHE RELEVANZ.....	20
1.8	ZIELSETZUNG .....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
2.1	MATERIALIEN .....	22
2.1.1	<i>Hersteller und Lieferfirmen.....</i>	22
2.1.2	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....</i>	23
2.1.3	<i>Verwendete Puffer.....</i>	24
2.1.4	<i>Geräte.....</i>	28
2.1.5	<i>Eingesetzte Peptide.....</i>	28
2.1.6	<i>Kryokonservierte Spermatozoen.....</i>	28
2.2	METHODEN .....	29
2.2.1	<i>Aufbereitung der Spermatozoen.....</i>	29

2.2.1.1	Kryokonservierung boviner Spermatozoen.....	29
2.2.2	<i>Kapazitation frischer boviner Spermatozoen.....</i>	29
2.2.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
2.2.2.2	Westernblot.....	31
2.2.2.3	Immunbiochemische Identifizierung von Proteinen .....	32
2.2.2.4	Chemilumineszenz.....	32
2.2.3	<i>Beurteilung der Vitalität und des akrosomalen Status boviner Spermatozoen ..</i>	33
2.2.3.1	Auswertungskriterien (FITC-PSA und H33258) .....	36
2.2.4	<i>Induktion der Akrosomreaktion durch physiologische Induktoren.....</i>	37
2.2.4.1	Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron .....	39
2.2.4.1.1	Zeitabhängigkeit der Progesteroninduktion.....	40
2.2.4.2	Induktion der Akrosomreaktion durch synthetische ZP3-Pepide.....	40
2.2.4.2.1	Dosisabhängigkeit der durch ZP3-6 induzierten akrosomalen Reaktion.....	42
2.2.4.3	Induktion der Akrosomreaktion mit Progesteron und ZP3-6 Peptid .....	42
2.2.4.4	Einfluss von Pertussistoxin (PTX) auf die Induktion der Akrosomreaktion.....	43
<b>3</b>	<b>STATISTIK.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
4.1	VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER KAPAZITATIONSMEDIEN .....	46
4.2	INDUKTION DER AKROSOMREAKTION BOVINER SPERMATOZOEN .....	48
4.2.1	<i>Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron.....</i>	48
4.2.1.1	Zeitabhängigkeit der Progesteroninduktion .....	50
4.2.2	<i>Induktion der Akrosomreaktion durch synthetische ZP3 Peptide.....</i>	51
4.2.2.1	Dosisabhängigkeit der durch ZP3-6 induzierten akrosomalen Reaktion .....	53
4.2.2.2	Induktion der Akrosomreaktion durch synthetische ZP2- und Porin- Peptide .....	55
4.2.3	<i>Dosisabhängigkeit der durch ZP3-6 induzierten akrosomalen Reaktion.....</i>	57
4.2.4	<i>Induktion der Akrosomreaktion mit Progesteron und ZP3-6 Peptid.....</i>	62
4.2.5	<i>Einfluss von Pertussistoxin (PTX) auf die mit ZP3-6 Peptid und Progesteron induzierte akrosomale Exozytose.....</i>	64

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>93</b>
8.1	TABELLARISCHER LEBENS LAUF .....	93
8.2	DANKSAGUNG.....	94

---

**Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
AR	Akrosomreaktion
ATP	Adenosin 5 Triphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
DF	Dekapazitationsfaktor
DIDS	4,4''-Diisothiocyano-Stilbene-2,2''- Disulfonicacid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco Phosphat Puffer Saline
ECL	Carbodiimid-1-ethyl-3-(3-dimethyl- aminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FF	Follikularflüssigkeit
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosin-5''-diphosphat
G-Proteine	Guaninnukleotid-bindende Proteine
GTP	Guanosin-5''-triphosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
La	Lanthan
LP	Lösungspuffer
ODF	Outer dense fibres
P4	Progesteron
Pen	Penicillin
PSA	Pisum sativum agglutinin
PTX	Pertussis Toxin
RT	Raumtemperatur
Temed	N,N,N',N' - Tetramethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
ZP	Zona pellucida

---

## **Bisherige Publikationen und Abstracts:**

### **Publikation:**

Hinsch E, Ponce AA, Hägele W, Hedrich F, Müller-Schlösser F, Schill WB, Hinsch KD (1997): A new combined in vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. Hum Reprod, 12(8) 1673-1681

### **Abstracts:**

Wunsch A, Hedrich F, Hinsch E, Böhm JG, Deiß R, Schill WB, Hinsch KD (1996): Porin antibodies detect antigens in different bovine flagellar compartments. Hum Reprod 11 (1): 192

Hinsch KD, Ponce AA, Hedrich F, Hägele W, Schill WB, Hinsch E (1996): Evaluation of bovine sperm function parameters after cryopreservation. Hum Reprod 11 (1): P033

Ponce AA, Hedrich F, Hinsch E, Müller-Schlösser F, Hägele W, Schill WB, Hinsch KD (1996): Effects of cryopreservation upon bovine sperm function parameters. Reprod Dom Anim 30(6):352

Wunsch A, Hedrich F, Hinsch E, Thinnies FP, Böhm JG, Deiß R, Schill WB, Hinsch KD (1996): Immunological identification of Porin in bovine spermatozoa. Reprod Dom Anim 30(6):384

# **1 Einleitung**

## **1.1 Grundlagen der Befruchtung**

Die Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermatozoon ist ein komplexes aus zahlreichen einzelnen Interaktionen bestehendes Ereignis.

Die Spermatozoen durchwandern den Zervikalkanal und das *cavum uteri*. Im Eileiter findet die eigentliche Befruchtung statt.

Die Eizelle ist von einem locker angeordneten Zellhaufen dem *cumulus oophorus* umgeben. Der *cumulus oophorus* besteht aus Follikelzellen, die in eine Matrix aus Hyaluronsäure eingebettet sind. Über feine Ausläufer steht er mit dem äußeren Anteil der *Zona pellucida* in Verbindung (Wassarman & Albertini, 1994). Erst wenn die Spermatozoen den *cumulus oophorus* durchdrungen haben, können sie mit der *Zona pellucida* in Kontakt treten (Wassarman; 1995). Die *Zona pellucida* umgibt die Eizelle wie eine Hülle.

Die Interaktion des Spermatozoons mit der *Zona pellucida* kann in mehrere Schritte gegliedert werden. In einem als primäre Bindung bezeichneten Schritt bindet sich das noch akrosomintakte Spermatozoon an die *Zona pellucida*. Im Anschluss an diese Bindung wird die Akrosomreaktion ausgelöst. Die Bindung des akrosomreagierten Spermatozoons an die *Zona pellucida* wird als sekundäre Bindung bezeichnet (Jansen et al., 1995). In einem weiteren Schritt durchdringt das Spermatozoon kanalartig die *Zona pellucida*.

Nach Überwinden des perivitilinen Spaltes, kommt es zur Fusion zwischen dem Oolemm und der inneren akrosomalen Membran des Spermatozoons.

Mit dem Eindringen des Spermatozookopfes in die Eizelle wird die Motilität des Spermatozoenschwanzes deutlich geringer und das Spermatozoon taucht vollständig in die Eizelle ein. Es werden eine Reihe morphologischer und biochemischer Veränderungen in und an der Eizelle initiiert. Zu diesen, unter dem Begriff der Aktivierung der Eizelle zusammengefassten Veränderungen, gehört die Exozytose der kortikalen Granula und die Beendigung der Meiose.

Damit liegt nun das genetische Material des Spermatozoons und das der Eizelle als haploider Chromosomensatz vor. Beide Zellkerne lösen sich auf und es entstehen jeweils ein weiblicher und ein männlicher Vorkern. Mit der Verschmelzung beider Vorkerne ist der Befruchtungsvorgang abgeschlossen. (Yanagimachi, 1994).

## 1.2 Die Spermatozoenmorphologie

Das Spermatozoon ist eine freie aktiv bewegliche Zelle. Es besteht aus einem Kopf und dem Schwanz.

Tab. 1

*Vergleichende Darstellung der Größenverhältnisse der Spermatozoen von Mensch, Maus und Rind [(Baccetti, 1998; Rüsse & Sinowatz, 1991, Stevens, 1990)]*

Spezies	Länge des Kopfes	Länge des Spermatozoenschwanzes
human	5 $\mu\text{m}$	55 $\mu\text{m}$
murin	8 $\mu\text{m}$	112 $\mu\text{m}$
bovin	8 $\mu\text{m}$	63 $\mu\text{m}$

### 1.2.1 Der Spermatozookopf

#### 1.2.1.1 Die Plasmamembran

Die Plasmamembran des Spermatozookopfes enthält unterschiedliche Membrandomänen, die über die Oberfläche zum Teil frei flottieren können. Diese Membrandomänen werden während des Reifungsprozesses und der Passage durch den Nebenhoden strukturell verändert, sowohl durch proteolytische Vorgänge (Phelps et al., 1990) im Sinne eines Demaskierens antigener Strukturen, als auch durch Anlagern antigener Moleküle. Solche Veränderungen begründen teilweise die unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften von epididymalen Spermatozoen im Vergleich zu ejakulierten Spermatozoen. So müssen bei epididymalen Spermatozoen deutlich höhere Konzentrationen von gelösten Zona pellucida Proteinen verwendet werden, um die Akrosomreaktion zu induzieren, als bei ejakulierten Spermatozoen (Florman & First, 1988).

Die Membran ist nicht als eine statische Hülle zu betrachten, sondern entspricht einem dynamischen Gebilde, durch dessen Veränderungen unterschiedliche Aktivitätszustände des Spermatozoons eingeleitet werden.

#### 1.2.1.2 Das Akrosom

Das Akrosom ist ein großes Vesikel, dessen Form und Größe speziesabhängig sind. Beim Rind (Abb. 1a), Mensch oder auch beim Hund liegt das Akrosom kappenförmig über dem

vorderen Anteil des Zellkerns. Bei der Maus (Abb. 1b) dagegen liegt das Akrosom als ein sichelförmiges Gebilde über dem Kern. Der Spermatozoonkopf wirkt dadurch bei der Maus hakenförmig.

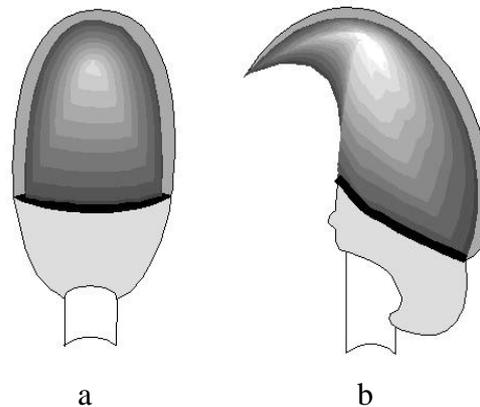


Abb. 1

*Schematische Darstellung unterschiedlicher Spermatozoon Kopfformen: a) bovines Spermatozoon, b) murines Spermatozoon.*

Da es sich bei dem Akrosom um ein dreidimensionales Gebilde handelt, kann eine innere akrosomale Membran von einer äußeren akrosomalen Membran unterschieden werden. Der Teil des Akrosoms, an dem die innere akrosomale Membran in die äußere akrosomale Membran übergeht, wird als äquatoriales Segment (Abb. 2) bezeichnet.

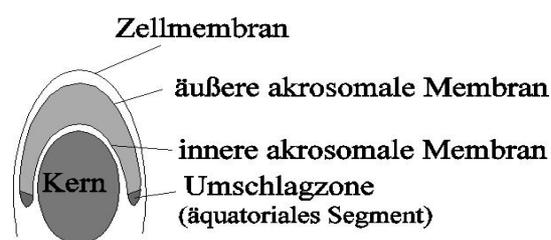


Abb. 2

*Schematische Darstellung der Lage des Akrosoms über dem Zellkern (bovines Spermatozoon).*

Die Entwicklung des Akrosoms aus einem proakrosomalen Granulum beginnt in der Spermatogenese im Stadium der frühen Spermatiden.

Funktionell gesehen ist das Akrosom ein spezialisiertes Lysosom, dessen Exozytose u.a. über G-Protein regulierte biochemische Kaskaden gesteuert wird.

### **1.2.1.3 Der Zellkern**

Der Hauptanteil des Spermatozoenkopfes besteht aus dem Zellkern; er enthält den haploiden Chromosomensatz. Distal liegt die Kernmembran der Basalplatte an, und nach proximal wird der Kern kappenförmig von dem Akrosom bedeckt. Der Anteil des Akrosoms, der den Kern überragt, wird als marginales Segment bezeichnet.

## **1.2.2 Der Spermatozoenschwanz**

Der Schwanz des Spermatozoons kann morphologisch in vier Abschnitte (Verbindungsstück, Mittelstück, Hauptstück, Endstück) gegliedert werden.

### **1.2.2.1 Das Verbindungsstück**

Das Verbindungsstück besteht hauptsächlich aus dem capitulum, einer bindegewebsartigen Struktur, welche für die Form und Größe des Übergangs von dem Spermatozoenkopf in den Schwanz verantwortlich ist. Am Ende des Verbindungsstückes, am Übergang in das Mittelstück, beginnt das Axonem (Abb.4). Es ist die einzige Struktureinheit, die in allen Abschnitten des Spermatozoenschwanzes gefunden werden kann. Es besteht aus 9+2 Mikrotubulidoubletten. In humanen Spermatozoen konnte eine ATPase Aktivität im Bereich der Dyneinarme der äußeren Doubletten und an den Verbindungsstellen zwischen der zentralen Doublette und den Radialspeichen nachgewiesen werden (Baccetti, 1984). Somit repräsentiert das Axonem den Teil des Spermatozoenschwanzes, der an der Motilität aktiven Anteil hat.

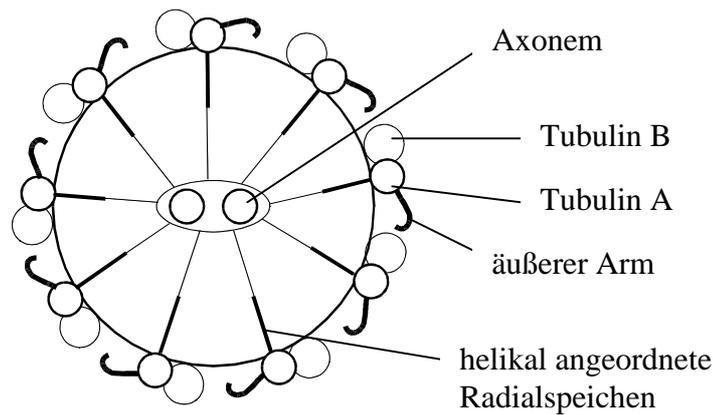


Abb. 3

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau des Axonems aus 9+2 Mikrotubulidubletten.

### 1.2.2.2 Das Mittelstück

Das Mittelstück ist durch das Vorhandensein der helikal angeordneten Mitochondrien gekennzeichnet. Die Mitochondrien umgeben dabei, getrennt durch ein submitochondriales Reticulum, die äußeren Mantelfasern (Olson & Winfrey, 1990). Beim Rind zum Beispiel ist das Mittelstück 12µm lang. Die kettenförmig angeordneten Mitochondrien sind beim Rind dabei so um die ODF gewickelt, dass sie 64 Windungen bilden.

Die Mitochondrien gelten als Energielieferanten für die Motilität des Spermatozoons.

### 1.2.2.3 Das Hauptstück

Im Bereich des Hauptstückes ist der Spermatozoenschwanz von einer fibrösen Hülle umgeben. Diese Hülle besteht aus zwei einander gegenüberliegenden säulenartigen Strukturen, die durch fibröse Bänder zu einer Hülle vernetzt werden.

Bis zur Mitte des Hauptstückes wird das Axonem von 9 ODF umgeben. Diese liegen außerhalb des Axonems und bilden mit diesem zusammen einen 9+9+2 Komplex. Die genaue Funktion der ODF ist noch unbekannt; wahrscheinlich tragen sie als elastische Stäbe ähnlich wie die fibröse Hülle passiv zur Spermatozoenmotilität und zur Stabilisierung des Flagellums bei.

### 1.2.2.4 Das Endstück

Hier verjüngt sich der Spermatozoenschwanz bis zur Schwanzspitze. Als wesentliches Strukturelement ist noch das Axonem nachweisbar.

Die wichtigsten Strukturelemente des Spermatozoenschwanzes hinsichtlich der Motilität des Spermatozoons sind das Axonem und die mitochondriale Hülle als aktive Komponenten, sowie die fibröse Hülle und die ODF als passive Strukturelemente, die für die Stabilität und Elastizität von Bedeutung sind.

Diese Strukturelemente sind für das Bewegungsmuster des Spermatozoons verantwortlich und ermöglichen es dem Spermatozoon, die Eizelle aktiv zu erreichen.

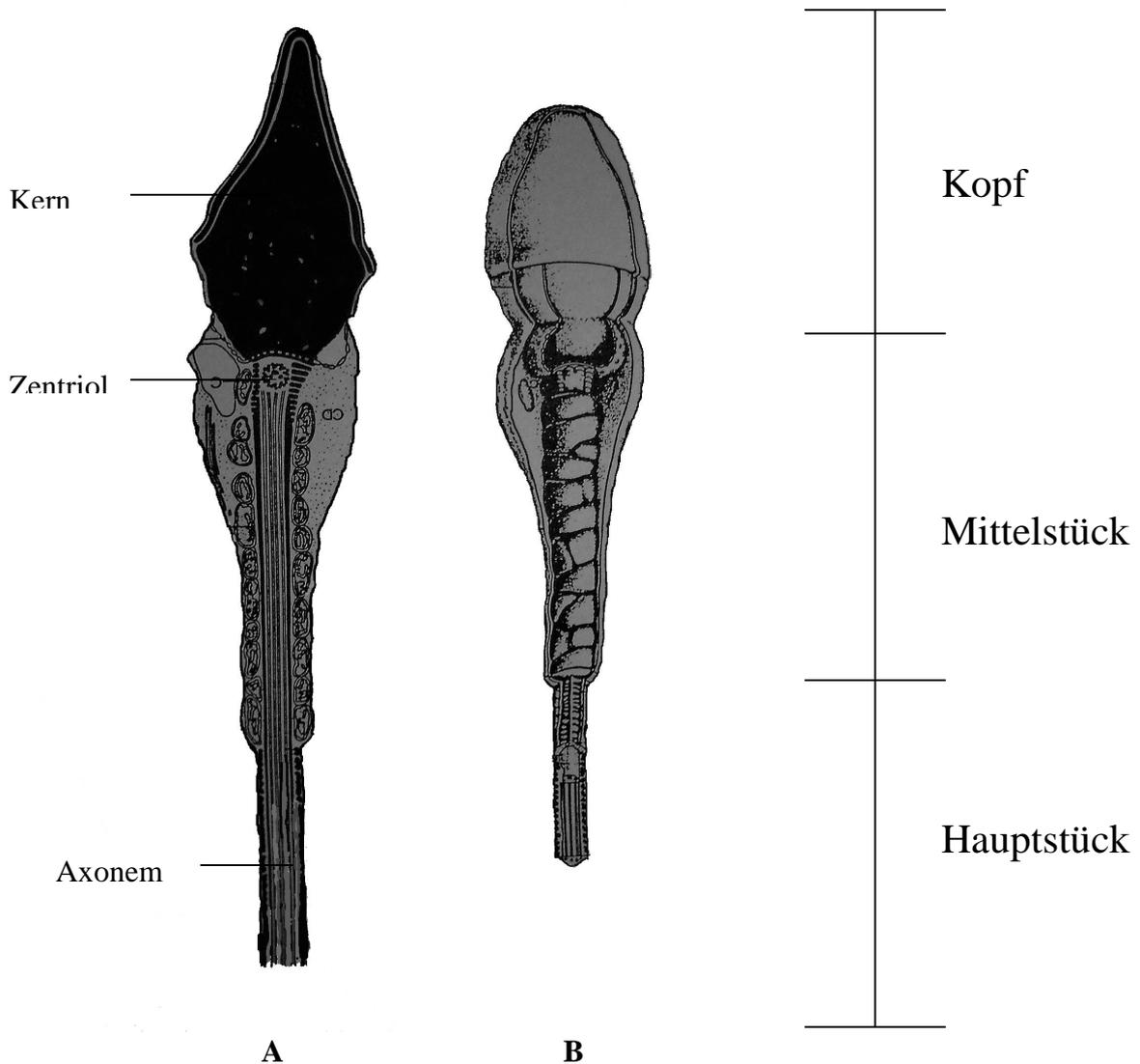


Abb. 4

Abbildung A zeigt einen Längsschnitt und Abbildung B die graphische Rekonstruktion des Feinbaues eines humanen Spermatozoons (Aus „Atlas of human spermiogenesis“, Grosse, Berlin 1981).

## 1.3 Spermatozoenfunktion

### 1.3.1 Kapazitation

Die Kapazitation ist ein reversibler Prozess, im Laufe dessen das Spermatozoon so verändert wird, dass es die Fähigkeit erlangt, eine Eizelle zu befruchten.

Die Zeit, welche die Spermatozoen für diesen Prozess benötigen, ist speziesabhängig und unterschiedlich lang (Yanagimachi, 1994).

So ist die Kapazitation einerseits Voraussetzung dafür, dass die Akrosomreaktion auf physiologischem Weg ausgelöst werden kann. Auf der anderen Seite ist es wichtig, dass die Akrosomreaktion erst dann stattfindet, wenn das Spermatozoon die Eizelle erreicht hat. Nur durch akrosomintakte Zellen kann die Zona pellucida der meisten Säugetierspezies (u.a. auch die des Menschen) durchdrungen werden. Eine Ausnahme sind die Spermatozoen des Meerschweinchens (Barros et al., 1992) und des Hasen (Kusan et al., 1984). Diese können auch im akrosomreagierten Zustand die Zona pellucida penetrieren.

Während der Kapazitation müssen sich fördernde und hemmende Faktoren in einem Gleichgewicht befinden. Bezüglich der Hemmung der Kapazitation wurde im Maussystem ein Dekapazitationsfaktor (DF) epididymalen Ursprungs beschrieben. Durch die Inkubation kapazitierter Spermatozoen mit diesem Faktor konnte die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen deutlich reduziert werden. Umgekehrt konnte durch sanfte Zentrifugation der DF von der Spermatozoenoberfläche dissoziiert und dadurch die Befruchtungsfähigkeit wiederum verbessert werden (Gupta et al., 1994). Andererseits enthält das Seminalplasma aber auch die Kapazitation fördernde Substanzen. So kann an epididymalen bovinen Spermatozoen die Akrosomreaktion nur mit der 1000-fachen Konzentration an Zona pellucida Protein induziert werden; erst nach einer einstündigen Präinkubation in Seminalplasma und anschließender Kapazitation kann bei diesen Spermatozoen die Akrosomreaktion wie an den ejakulierten Spermatozoen ausgelöst werden (Florman & First., 1988).

Auch Veränderungen in der Lipidarchitektur der äußeren akrosomalen Membran und Plasmamembran sind Bestandteile der Kapazitation. So konnte durch eine Inkubation mit cholesterolarmen Liposomen deutlich die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion erhöht werden. Dabei wurde den Spermatozoen bis zu 30% ihres Cholesterols entzogen (Ehrenwald et al., 1988).

Seitdem Serumalbumin als einer der Hauptfaktoren für die Förderung der Fertilisation im Hamstermodell beschrieben wurde (Lui CW et al., 1977), wurde es als Kapazitationsförderer in mehreren Tiermodellen eingesetzt. Der Wirkungsmechanismus des Serumalbumin ist noch unklar. Bekannt ist, dass bovines Serumalbumin (BSA) Fettsäuren und andere lipophile Moleküle binden kann und selber unspezifisch an das Spermatozoon bindet. Ebenso können sulfatierte Glykoconjugate, wie Heparin und Dextransulfate, den Kapazitationsprozess unterstützen. Erste Hinweise für diesen Effekt kamen aus Untersuchungen an Seeigelspermatozoen, bei denen festgestellt wurde, dass Fucose-Sulfat-Konjugate auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme fördern (Parrish et al., 1989; Miller et al., 1990).

Hinsichtlich der Ionenkonzentrationsveränderungen während der Kapazitation, ist der Kalziuminflux von entscheidender Bedeutung (Didion et al., 1989). Dieser Kalziumeinstrom während der Kapazitation scheint bei Säugetierspermatozoen über drei verschiedene Mechanismen reguliert zu werden.

#### 1. $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase:

Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase kann  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle herausschleusen und wirkt damit der Kapazitation entgegen. Es konnte gezeigt werden, dass durch Quercetin, welches die ATPase hemmen kann, die Kapazitation beschleunigt werden konnte (Wang et al., 1995; Fraser, 1995, Fraser, 1994; Fraser & Dermott, 1992). Auch der zuvor beschriebene DF scheint diese ATPase beeinflussen zu können. Durch eine Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bewirkt er einen verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom und damit eine Hemmung der Kapazitation.

#### 2. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschpumpe:

Im bovinen System konnte gezeigt werden, dass Caltrin (ein niedermolekulares Protein, das im Seminalplasma vorkommt) diesen Austauschmechanismus hemmen kann, wodurch weniger  $\text{Ca}^{2+}$  im Austausch gegen  $\text{Na}^+$  in die Zelle gepumpt wird. Dieser Vorgang bedingt die Hemmung der Kapazitation. Gelangen die Spermatozoen dann in den weiblichen Genitaltrakt, erfährt dieses Protein eine Konformationsänderung und kann dadurch den Austausch von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  stimulieren (Lardy et al., 1989).

#### 3. $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle:

Hier werden verschiedene Kanäle unterschieden durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen langsam, aber auch schnell, in die Zelle einströmen können.

Die Membranveränderungen, die den schnellen Kalziumeinstrom ermöglichen, machen einen wesentlichen Teil des Kapazitationsvorganges aus. So konnte gezeigt werden, dass zur Induktion der Akrosomreaktion mit Substanzen, die in der Kaskade oberhalb des

Kalziumeinstroms wirken (z.B. Progesteron), die Spermatozoen notwendiger Weise kapazitiert sein müssen. Denn ohne die Öffnung der schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle können solche Substanzen nicht die Akrosomreaktion induzieren.

Des Weiteren werden während der Kapazitation auch die intrazelluläre Natrium-, Kalium- und Bikarbonatkonzentration verändert. So wurde berichtet, dass durch die Inkubation der Spermatozoen in Anwesenheit von Bikarbonat/ $\text{CO}_2$  die Membran destabilisiert wird (Harrison et al., 1995).

Die Natriumkonzentration steigt intrazellulär nur geringgradig an ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase). Während der Kapazitation scheint die Aktivität dieser Pumpe erniedrigt zu sein. Dieses stimmt auch mit den Ergebnissen überein, dass durch eine Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit Hilfe von Ouabain die Kapazitation beschleunigt werden kann (Fraser et al., 1994).

Auch der intrazelluläre pH-Wert steigt während der Kapazitation an. So können bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,8 die Spermatozoen besser kapazitiert werden als bei einem niedrigeren pH-Wert (Vredenburg-Wilberg & Parrish, 1995). Durch eine Senkung des extrazellulären pH-Wertes unter 7,02 wurde die Kapazitation gehemmt (Parrish et al., 1989; bovines System).

Dieser komplizierte noch wenig verstandene Prozess der Kapazitation vollzieht sich während die Spermatozoen den weiblichen Genitaltrakt durchwandern.

### 1.3.2 Akrosomreaktion

Im Eileiter durchdringen die Spermatozoen den *cumulus oophorus*. Die Mitwirkung akrosomaler Enzyme an diesem Prozess ist im Detail noch nicht bekannt.

Die bekannteste akrosomale Protease ist das Proakrosin, eine dem Trypsin ähnliche Serin Protease, die aus einer leichten und einer schweren Kette besteht.

Das Proakrosin, welches die enzymatisch inaktive Form des Akrosins darstellt, kann an die Zona pellucida binden (Tesarik et al., 1988) und befindet sich auch bei dem akrosomreagierten Spermatozoon auf der inneren akrosomalen Membran. Deshalb wird Proakrosin im Zusammenhang mit der sekundären Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida diskutiert (Jansen et al., 1998).

Nach Abspaltung der leichten Kette (Töpfer-Petersen et al., 1990) entsteht das enzymatisch aktive  $\alpha$ -Akrosin (Abb.5). Dieses ist, ähnlich wie Trypsin, in der Lage die Zonaglykoproteine hydrolytisch zu spalten (Dunbar et al., 1991). Durch die enzymatische Aktivität des  $\alpha$ -

Akrosins kann das Spermatozoon mit dem Kopf voran in die Zona pellucida eindringen. Durch eine weitere Autolyse entsteht aus  $\alpha$ -Akrosin  $\beta$ -Akrosin. Das  $\beta$ -Akrosin besitzt zwar keine Zonabindungsaktivität mehr, ist aber weiterhin hydrolytisch aktiv. Mit dem weiteren Vordringen in die Zona pellucida wird das  $\beta$ -Akrosin abgebaut.

Häufig verbleiben, auch nach vollendeter Exozytose, noch Reste akrosomalen Inhaltes im Bereich des äquatorialen Segmentes zurück. Durch Anfärbung akrosomaler Glykoproteine erscheint dieser Bereich dann bei akrosomreagierten Spermatozoen als ein farbiges Band, das den Spermatozoonkopf zirkulär umgibt. Es verläuft etwa auf halber Höhe des Spermatozoonkopfes. In dieser Form kann das äquatorielle Band, z.B. beim Menschen, beim Rind und bei Spermatozoen vom Hasen angefärbt werden (Abb.2).

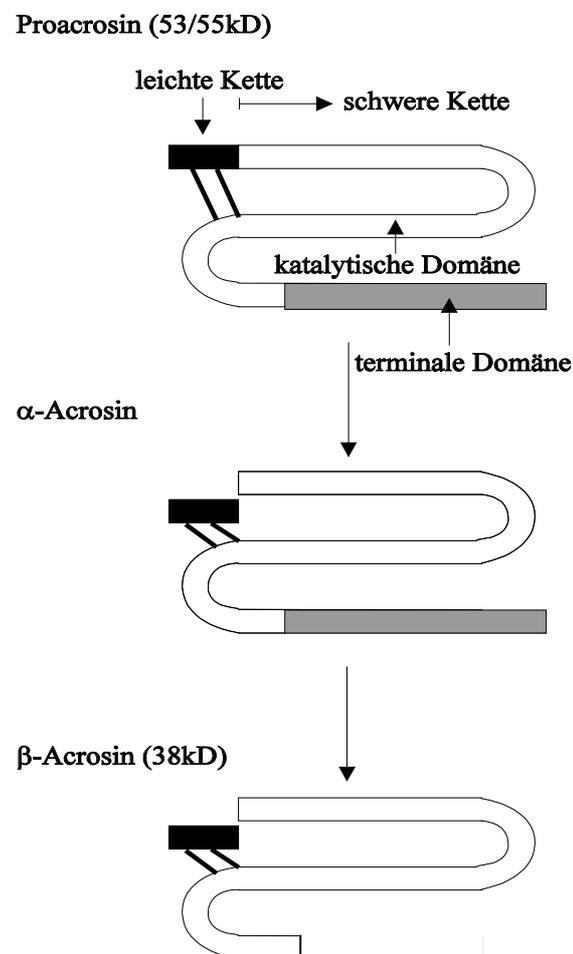


Abb. 5

*Schematische Darstellung der Aktivierung des Proacrosin zu Acrosin (nach Töpfer-Petersen et al., 1990).*

In einem als primäre Bindung beschriebenen Vorgang binden die Spermatozoen an die Zona pellucida. Vermittelt wird diese Bindung wahrscheinlich durch Oligosaccharide des ZP3 Proteins (Saling, 1989; Yanagimachi, 1994).

In einem als sekundäre Bindung beschriebenen Prozess können die Spermatozoen mit Strukturen auf der inneren akrosomalen Membran an die Zona pellucida binden und sie mit Hilfe von Proteasen durchdringen (Wassarman, 1994).

Das in Abbildung 6 gezeigte Schema basiert auf Untersuchungen am Mausmodell. Die Rezeptor/Zona pellucida Interaktion wird hierbei als ein zweigliedriger Prozess dargestellt. Ein Teil des Rezeptors ist für die Bindung an die Glykoproteine entscheidend, während eine andere Komponente des Rezeptors die Stoffwechselkaskade anstößt, die dann zur Induktion der Akrosomreaktion führt.

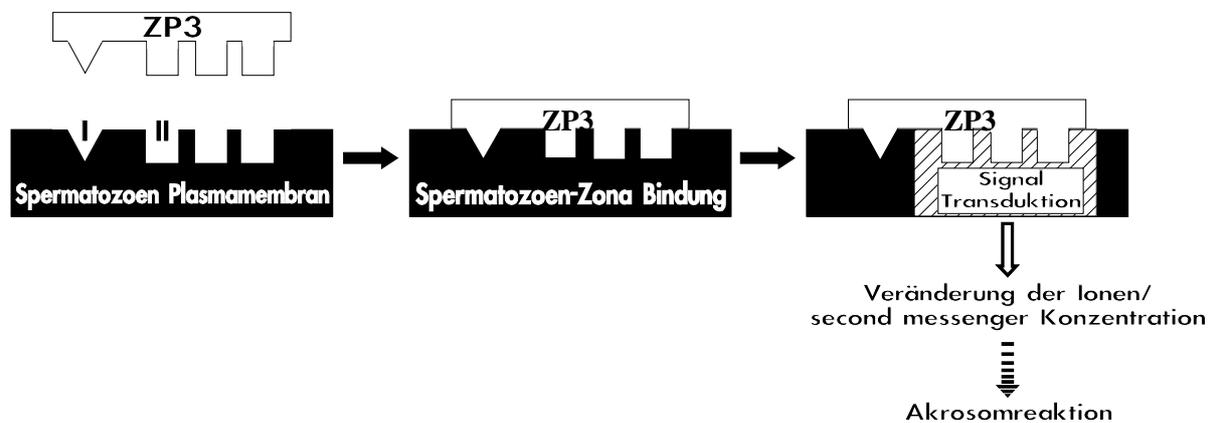


Abb. 6

*Modell zur Spermatozoen-Zona pellucida Interaktion. ZP3 besitzt zwei miteinander verknüpfte Rezeptormoleküle: I für die primäre Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung; II für die Induktion der akrosomalen Reaktion. Modifiziert nach Kopf & Gerton 1991.*

Bei der Akrosomreaktion (Abb. 7) kommt es zuerst zu einem partiellen Verschmelzen der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran. Es bilden sich aus beiden Membrananteilen Hybridvesikel. Dadurch kommt es zu einer Fenestrierung des Akrosoms durch die akrosomaler Inhalt austreten kann. Im weiteren Verlauf der Akrosomreaktion entwickelt sich so die vollständige Ablösung der äußeren akrosomalen Membran einschließlich der ihr anliegenden Plasmamembran. Nach Abschluss der Akrosomreaktion liegt die innere akrosomale Membran frei über dem vorderen Anteil des Zellkerns. Nur im

Bereich des äquatorialen Bandes können sich noch Reste akrosomalen Inhaltes befinden (Abb.2).

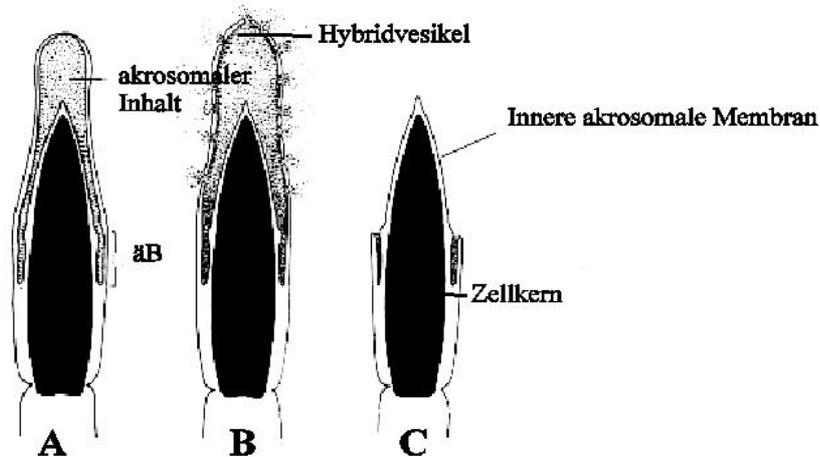


Abb. 7

*Schematischer Ablauf der Akrosomreaktion im Säugetierspermatozoon. A: Spermatozoenkopf mit intaktem Akrosom B: Partielle Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran, die sogenannte Fenestrierung beginnt. C: Vollständige Ablösung der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran mit Resten akrosomalen Inhaltes im Bereich der Umschlagfalte (äB: äquatoriales Band)*

Spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle vom L-Typ, wie sie auch im Skelettmuskel vorkommen, scheinen bei der agonisten-induzierten Akrosomreaktion eine bedeutende Rolle zu spielen (Blackmore & Eisoldt, 1999). So konnte die mit Zona pellucida induzierte Akrosomreaktion beim Bullen, sowie die durch Progesteron induzierte Akrosomreaktion beim Menschen, signifikant durch Kalziumkanalantagonisten gehemmt werden (Fraser, 1993). Auch konnte gezeigt werden, dass durch diese trivalenten und divalenten Kationen ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) nicht die Kapazitation, sondern ausschließlich die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion gehemmt wurde (White & Aitken, 1989). Damit ist der schnelle Kalziumeinstrom als ein wesentlicher Bestandteil der Induktion der Akrosomreaktion zu betrachten.

Die Bedeutung des Kalziumeinstroms für die Akrosomreaktion konnte auch bei Experimenten mit Kalziumionophor, welches  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle schleust, gezeigt werden. Bei einer niedrigen extrazellulären Kalziumkonzentration konnte die Akrosomreaktion nicht mehr durch Kalziumionophor induziert werden (Fraser, 1994).

Trotzdem sind der schnelle Kalziumeinstrom und die Akrosomreaktion nicht direkt miteinander gekoppelt. So ist auch eine hohe extrazelluläre Natriumkonzentration für die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion wichtig. Ein Natriumeinstrom scheint dem Kalziumeinstrom sogar noch voranzugehen, wobei es durch den Natriumeinstrom zu einem Anstieg des intrazellulären pH kommt (Garcia et al., 1999).

Progesteron gilt neben dem Zona pellucida Protein als physiologischer Induktor der Akrosomreaktion. Es wird in den Zellen des *cumulus oophorus* gebildet und konnte auch in der Follikularflüssigkeit nachgewiesen werden (Osman et al., 1989).

Bei dem Progesteron-Rezeptor handelt es sich um einen Oberflächenrezeptor (Cheng et al., 1998), wie in Versuchen mit an BSA gekoppeltem Progesteron gezeigt wurde (Blackmore et al., 1991; Tesarik et al., 1992; Ambhaikar & Puri, 1998). Durch eine Markierung dieses Komplexes über FITC-markiertes BSA konnte aber nur bei 10 - 30% der humanen kapazitierten Spermatozoen dieser Progesteron-Rezeptor-Komplex nachgewiesen werden.

Durch Einsatz eines gegen den *intrazellulären* Progesteronrezeptor gerichteten monoklonalen Antikörpers konnte die Induktion der Akrosomreaktion gehemmt werden (Baldi et al., 1999). In immunochemischen Untersuchungen konnte dann gezeigt werden, dass dieser Antikörper im Western-Blot ein 50kDa Protein erkennen kann. Wie aus anderen Untersuchungen bekannt war, hat die Untereinheit A des neuronalen GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (Chlorid-Kanal-Komplex) auch ein Molekulargewicht von 50kDa (Sabeur et al., 1996, Kuroda et al., 1999). Dieser Befund wurde dahingehend gedeutet, dass Progesteron an einen Steroid-Rezeptor/Chlorid-Kanal-Komplex bindet.

Bei der durch Progesteron induzierten Akrosomreaktion humaner Spermatozoen wird postuliert, dass dieser Komplex durch die Bindung des Progesterons aktiviert wird. Nachfolgend kommt es zu einem Chlorideinstrom und zu einer Aktivierung eines Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Austauschmechanismus. Bikarbonat gelangt in die Zelle, und der intrazelluläre pH-Wert steigt an. Im Mausystem konnte gezeigt werden, dass durch DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-Disulfonicacid), einem Antagonisten dieses Austauschmechanismus, die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion kapazitierter Spermatozoen gehemmt werden kann (Kopf & Gerton, 1990). Ebenso konnte auch durch Chloridkanalantagonisten (Bicuculine) die Progesteron induzierte Akrosomreaktion gehemmt werden (Wistrom & Meizel, 1993). So scheint also bei der Maus ein Chlorideinstrom für die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion von Bedeutung zu sein. Dazu passend wurde im murinen System ein membranständiges

---

Progesteron-bindendes Protein beschrieben (Kwon & Eddy 1997), das für die Progesteron induzierte Akrosomreaktion von Bedeutung sein könnte.

An menschlichen Spermatozoen dagegen konnte ein schneller Chloridefflux nach der Progesteroninduktion gezeigt werden, der durch PicROTOXIN gehemmt werden konnte (Tumer et al., 1994). Womöglich verursacht dieser Chloridefflux eine Membrandepolarisation und führt damit zu der Aktivierung eines  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  Austauschmechanismus. Dadurch gelangt Bikarbonat in die Zelle und führt dort zu einem pH Anstieg.

## **1.4 Eizelle**

Die Eizelle ist eine kugelförmige, cytoplasmareiche Zelle. Zum Zeitpunkt der Ovulation besitzt die humane Eizelle einen Durchmesser von 120-150 $\mu\text{m}$  (Bucher & Wartenberg, 1989). Damit ähnelt sie hinsichtlich ihrer Größe den Eizellen von Schwein und Rind.

Die primäre Oozyte beendet kurz vor der Ovulation ihre erste Reifeteilung. Während der Ovulation beginnt die zweite Reifeteilung. Bis zur Befruchtung verharrt der Kern im Stadium der Metaphase II (Moore, 1985).

Die Zona pellucida umschließt als eine Art Schutzhülle die Oozyte. Zwischen Eizelle und Zona pellucida befindet sich der Perivitellin-Spalt.

### **1.4.1 Zona pellucida**

Die Zona pellucida ist eine aus Glykoproteinen aufgebaute Hülle, die die Eizelle vollständig umgibt. Untersuchungen im Maussystem haben gezeigt, dass die Glykoproteine der Zona pellucida ausschließlich von der Eizelle gebildet werden. Durch in situ Hybridisationsversuche konnte gezeigt werden, dass nur die Eizelle, und nicht die sie umgebenden Follikelzellen, in der Lage war, die verschiedenen Glykoproteine zu bilden (Liang et al., 1990). Für andere Spezies wird dies momentan kontrovers diskutiert. Gegenwärtig ist noch unklar, ob es über die Mikrovilli der Oozyte eine Kontaktaufnahme hinsichtlich einer interzellulären Kommunikation mit den Kumuluszellen gibt.

Die Dicke der Zona ist von Spezies zu Spezies unterschiedlich. Sie reicht über 5 $\mu\text{m}$  bei der Maus, 13 $\mu\text{m}$  beim Menschen, 16 $\mu\text{m}$  beim Schwein bis zu 27 $\mu\text{m}$  beim Rind (Dunbar, 1983).

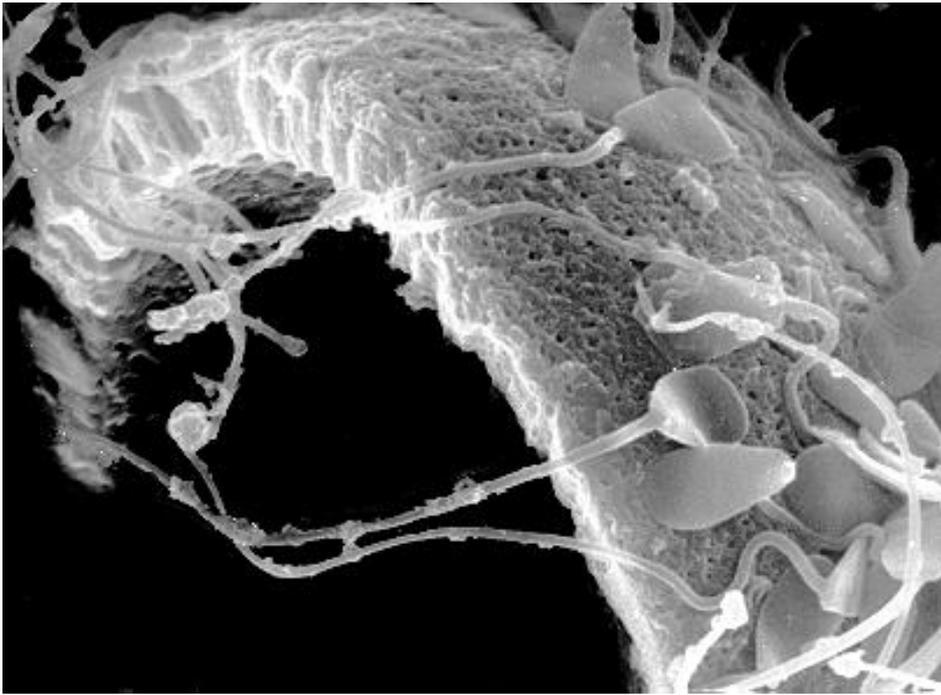


Abb. 8

*Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer bovinen Heminzona mit an der konvexen Außenseite gebundenen Rinder-Spermatozoen (Vergrößerung x 2500).*

Speziesspezifisch besteht die Zona pellucida aus zwei bis vier unterschiedlichen Glykoproteinen. In Maus, Hamster, Ratte, Kaninchen und Mensch konnten drei unterschiedliche Glykoproteine nachgewiesen werden (Maresh & Dunbar, 1978; Shabanowitz & O'Rand, 1988; Araki et al., 1992; Miller et al., 1992). Im am besten untersuchten Modell, der Maus, werden die unterschiedlichen Glykoproteine als Zona pellucida Protein ZP1 oder ZPB, Zona pellucida Protein ZP2 oder ZPA und Zona pellucida Protein ZP3 oder ZPC bezeichnet. Aufgrund unterschiedlicher posttranslationaler Glykosylierungen und Sulfidierungen können die Molekularmassen jeweils nur annähernd genau angegeben werden (ZP1=185-200kDa, ZP2=120-140kDa, ZP3=83kDa) (Epifano & Dean, 1994).

#### **1.4.1.1 Das Zona Pellucida 3-Protein**

Das Zona pellucida 3-Protein (ZP3) gilt als primärer Rezeptor für die Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida. Die meisten Hinweise für diese Funktion stammen aus dem Mausmodell.

Untersuchungen mit radioaktiv markiertem ZP3 Protein zeigten, dass ZP3 Protein im Kopfbereich akrosomintakter Spermatozoen bindet, während keine Bindung an akrosomreagierten Spermatozoen nachgewiesen werden kann (Bleil & Wassarman, 1986). Es wurde berechnet, dass das Spermatozoon über das Akrosom verteilt zwischen 10.000 und 50.000 Bindungsstellen für das ZP-3 Protein besitzt, während im Schwanzbereich keine Bindungsstellen dargestellt werden können (Bleil & Wassarman, 1986).

Eine weitere wichtige Funktion des ZP3-Proteins ist die Induktion der Akrosomreaktion (Bleil & Wassarman, 1990; Saling, 1989).

Es stehen vollständige cDNA-Klone von den Zona pellucida Proteinen ZP3 und ZP2 aus unterschiedlichen Säugetierspezies zur Verfügung (z.B. Maus, Hamster, Mensch, Kaninchen, Schwein, Katze und Rind) (Liang et al., 1990; Chamberlin & Dean, 1990; Kinloch et al., 1990; Liang & Dean, 1993; Lee et al., 1993; Thillai-Koothan et al., 1993; Schwoebel et al., 1991; Yurewicz et al., 1993; Harris et al., 1994). Vergleiche dieser bekannten cDNA Codes erbrachten Homologien zwischen 70% und 85% bei den untersuchten Spezies.

Wichtig für die Bindung des Spermatozoons an das ZP3 Protein scheint das Glykosylierungsmuster zu sein. So konnte gezeigt werden, dass durch einen monoklonalen Antikörper gegen die Polypeptidkette des ZP3 Proteins die Bindungskapazität der Spermatozoen an die Zona pellucida nicht beeinflusst wird (Florman et al., 1984; Florman & Wassarman, 1985). Wurde das ZP3 Protein durch eine Pronase in kleine Oligopeptide gespalten, so konnten diese ebenso gut wie das native ZP3 Protein an die Spermatozoen binden. Entsprechend konnte auch durch eine Präinkubation der Eizelle mit ZP3 Oligopeptiden die Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida gehemmt werden (Florman & Wassarman, 1985).

Diese kleinen Glykoproteine konnten aber im Gegensatz zum nativen oder rekombinanten ZP3-Glykoprotein die Akrosomreaktion nicht induzieren (Florman, 1984; Wassarman, 1990, Leyton & Saling, 1989).

Diese Befunde können als Hinweis dafür dienen, dass für die Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida das Glykosylierungsmuster entscheidend ist, für die Induktion der Akrosomreaktion aber die Intaktheit des Proteingerüsts des ZP3-Proteins den entscheidenden Faktor darstellt (Kopf, 1990).

Nach einem von G. Kopf vorgeschlagenen Modell kommt es, nachdem das Spermatozoon an die Zona pellucida gebunden hat, erst durch das Zusammenspiel mehrerer funktioneller

---

Liganden (Abb. 6) zum Auslösen derjenigen biochemischen Prozesse, an deren Ende die Induktion der Akrosomreaktion steht (Kopf, 1990).

## 1.5 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Sie spielen bei der transmembranären Signaltransduktion der Zelle eine wichtige Rolle. Abb. 9 zeigt schematisch den Aktivierungs- und Inaktivierungszyklus dieser Proteine. Das inaktive G-Protein hat GDP an seine  $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Durch Aktivierung des Rezeptors und Interaktion mit dem G-Protein wird GTP im Austausch mit GDP gebunden. Sowohl die aktivierte G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit als auch der  $\beta/\gamma$ -Komplex können danach mit dem Effektor interagieren und diesen modulieren.

Beendet wird der aktivierte Zustand des G-Proteins durch die hydrolytische Abspaltung eines Phosphatrestes (GTP-ase Aktivität) und die anschließende Reassoziierung von  $\alpha$ -GDP mit dem  $\beta/\gamma$ -Komplex. Pertussistoxin kann diesen Zyklus unterbrechen. Es überträgt den ADP-Ribose-Anteil von NAD auf einen Cystinrest der  $\alpha$ -Untereinheit bestimmter G-Proteine, die so nicht mehr über einen Rezeptor aktiviert werden können. Es wird vermutet, dass bei der Induktion der Akrosomreaktion durch ZP3-Protein GTP bindende Proteine der Klasse  $G_i$  eine Rolle spielen (Kopf et al., 1986; Kopf, 1990). Im Maussystem konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung dieses Proteins auch die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch solubilisierte Zona pellucida dosisabhängig gehemmt werden kann.

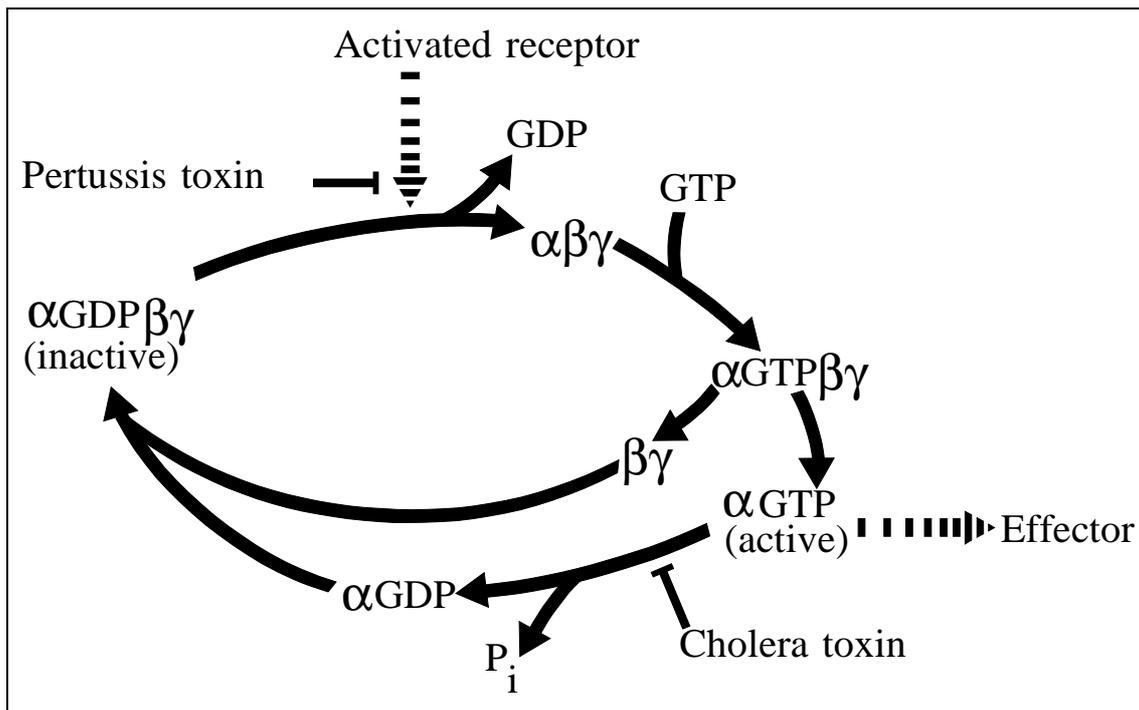


Abb. 9

*Funktionelle Rolle von G-Proteinen in der Signaltransduktion. Nach Aktivierung eines Rezeptors wird GDP, das mit der G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit fest assoziiert ist, durch GTP ausgetauscht. Dies führt zur Dissoziation der  $\alpha$ -GTP-Untereinheit und  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit und auch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit können mit einem Effektormolekül interagieren. Nach Hydrolyse von gebundenem GTP (GTPase-Aktivität) an der  $\alpha$ -Untereinheit, reassoziieren die  $\alpha$ -GDP- und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit zum Heterotrimer. Pertussistoxin kann selektiv die G-Protein-Rezeptor-Interaktion blockieren (nach Gilman, 1987).*

Immunhistochemisch konnten im Spermatozonenkopfbereich sowohl Pertussistoxin-sensitive  $G_{i1}$ -,  $G_{i2}$ - und  $G_{i3}$ -Proteine, als auch Pertussistoxin-insensitive G-Proteine ( $G_q$ ,  $G_{11}$ ) nachgewiesen werden (Garty et al., 1988; Glassner et al., 1991; Ning et al., 1995).

Funktionelle Untersuchungen im Mausmodell, beim Bullen und auch bei menschlichen Spermatozoen konnten die Beteiligung von G-Proteinen an der Zona pellucida vermittelten Signaltransduktion bestätigen. So führte eine Inkubation kapazitierter Spermatozoen mit Pertussistoxin dazu, dass die Spermatozoen zwar nach wie vor an die Eizelle binden konnten, aber nicht mehr zur Durchführung der Akrosomreaktion fähig waren (Endo et al., 1988).

Untersuchungen mit Progesteron als Induktor der Akrosomreaktion erbrachten im Gegensatz dazu keine reduzierte Induzierbarkeit der Akrosomreaktion an kapazitierten, mit Pertussistoxin präinkubierten Mausspermatozoen. Dieser Befund weist darauf hin, dass Progesteron und Zona pellucida Proteine über zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege die Akrosomreaktion modulieren.

## 1.6 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung von Spermatozoen wurde beim Tier (z.B. Rind) entwickelt, um bestimmte Rassemerkmale, wie zum Beispiel eine hohe Milchproduktion, durch Züchtung zu optimieren und genetisches Material zu konservieren.

Für die Kryokonservierung boviner Spermatozoen werden unterschiedliche Kryoprotektiva wie z.B. Biociphos<sup>®</sup> und Triladyl<sup>®</sup> verwendet. Bei dem Kryoprotektivum Triladyl<sup>®</sup> handelt es sich um einen eidotterhaltigen Tris-Verdünner. Wie Untersuchungen gezeigt haben, besteht bei diesem Tris-Verdünner bedingt durch die Präparation des Eidotters immer ein erhöhtes Risiko für eine bakterielle Kontamination (Thibier et al., 2000). Trotz Abflammens der Eioberfläche konnten hochgradig Antibiotika-resistente Keime der Spezies Pseudomonas in frisch hergestellten Verdünnerchargen nachgewiesen werden. Bedenklich daran schien, dass diese Keime auch in der Lage waren, die Tiefgefrier-Konservierung zu überstehen. Ein anderer Nachteil dieses Verdünners ist darin begründet, dass Eidotter-Bestandteile bei wissenschaftlichen Fragestellungen nicht vollständig aus den Spermatozoenproben herausgewaschen werden können und dadurch Protein-biochemische Analysen nicht möglich sind.

Das neu entwickelte Kryoprotektivum Biociphos<sup>®</sup> ist ein eidotterfreier Verdünner, dem pflanzliche Lecithine zugesetzt wurden. Bedingt durch die Möglichkeit der industriellen Herstellung wird Biociphos<sup>®</sup>, anders als bei Triladyl<sup>®</sup>, unter sterilen Bedingungen produziert und zum Endverbraucher verschickt. Auch kann das Kryoprotektivum Biociphos<sup>®</sup> besser aus den Spermatozoenproben entfernt werden und ermöglicht dadurch biochemische Untersuchungen, sowie eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Untersuchungen mit portioniertem kryokonservierten Ejakulat.

## 1.7 Klinische Relevanz

Die vorliegende Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der Spermatozoen-Eizell-Interaktion beitragen.

Da für eine natürliche Befruchtung die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion ein wichtiger Bestandteil ist, ist es bei vorliegender männlicher Infertilität von diagnostischem Interesse festzustellen, ob ein Spermatozoon zur Akrosomreaktion überhaupt fähig ist. Um die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion untersuchen zu können, ist ein Testsystem wünschenswert, das den physiologischen Verhältnissen möglichst nahe kommt und reproduzierbar ist. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind diese physiologischen Prozesse nur unzureichend bekannt. Durch genauere Kenntnisse über die Induktor-Rezeptor-Interaktion wäre es möglich, funktionelle Tests mit hohem prognostischen Aussagewert zu entwickeln.

Ein anderer Gesichtspunkt, ist die Entwicklung neuer Kontrazeptiva wie z.B. die Immun-Kontrazeption.

In erster Linie besteht die klinische Relevanz in der Entwicklung gut funktionierender, möglichst physiologischer Testsysteme, die eine stringente Diagnostik und Therapie bei Paaren mit ungewollter Kinderlosigkeit ermöglichen. Neben der Analyse der Spermatozoendichte und dem Motilitätsmuster ist auch die Kenntnis von der Funktionsfähigkeit der Spermatozoen von Bedeutung. Nur dann ist es möglich, Paare schon frühzeitig der für sie optimalen Therapie zuweisen zu können. So kann durch das Verstehen der Physiologie und Pathophysiologie der Spermatozoenfunktion die psychische und physische Belastung der Patienten reduziert werden. Zum anderen können Kosten für die Therapie im Sinne der „evidence based medicine“ minimiert und damit die Effizienz der Behandlung gesteigert werden.

## 1.8 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, Signaltransduktionsmechanismen der bovinen Spermatozoen-Zona pellucida Interaktion mit Hilfe eines reproduzierbaren *in vitro* Testsystems zu untersuchen. Auf molekularer Ebene sollte die Wirkung von synthetischen Zona pellucida Peptiden auf die akrosomale Exozytose boviner Samenzellen sowohl auf Rezeptorebene als auch in Bezug auf die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade evaluiert werden.

Folgende Teilziele wurden definiert:

- 
1. Der Aufbau eines validen und reproduzierbaren *in vitro* Testsystems für die Bestimmung des akrosomalen Status kryokonservierter Rinderspermatozoen.
  2. Die Überprüfung des Testsystems mit physiologischen Induktoren der Akrosomreaktion (Progesteron und bovine Zona pellucida Proteine).
  3. Der Einsatz synthetischer ZP Peptide und der Nachweis von ZP3 Proteindomänen, die eine Bedeutung für die Induktion der akrosomalen Reaktion in Bullenspermatozoen haben.
  4. Untersuchungen zur Frage, ob die ZP3 Peptid-induzierte akrosomale Exozytose über eine G Protein-regulierte transmembranäre Signaltransduktionskaskade moduliert wird.

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Untersuchungen waren anwendungsorientiert konzipiert und sollten einerseits neue Möglichkeiten für die Behandlung und Diagnostik männlicher Unfruchtbarkeit eröffnen und andererseits für die Entwicklung innovativer Kontrazeptiva für Mensch und Tier von Bedeutung sein.

---

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Hersteller und Lieferfirmen**

- (1) Amersham, Little Chatfort GB
- (2) Bayer, Leverkusen
- (3) Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, New Jersey, USA
- (4) Bio Mol
- (5) Bio-Rad Herkules, USA
- (6) Bio-Rad, München
- (7) Eppendorf, Hamburg
- (8) Eurobio, Raunheim
- (9) Fuji, Frankfurt
- (10) Greiner Labortechnik, Frickhausen
- (11) Haereus, Hanau
- (12) Jahnke & Kunkel Labortechnik, Staufen
- (13) Jouan GmbH, Unterhaching
- (14) Kalensee, Gießen
- (15) Kodak, Stuttgart
- (16) Menzel Gläser, Braunschweig
- (17) Merck, Darmstadt
- (18) Milipore Corporation, Bedford, Maryland, USA
- (19) Phillips, Eindhoven, Niederlande
- (20) Riedel-de-Haen, Seelze
- (21) Roth, Karlsruhe
- (22) Serva, Heidelberg
- (23) Sigma Diagnostics, Taufkirchen
- (24) Spectrum Medical, Houston, Texas, USA

- (25) WU, Mainz  
(26) Zeiss, Frankfurt  
(27) Fa. I. M. V, L'Aigle, Frankreich

### 2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

β-Mercaptoethanol	(21)
Aceton	(19)
Acrylamidlösung	(5)
Albumin Bovine Fraktion V; no. 4503	(23)
Albumin Bovine Fraktion V; no. 9647	(23)
Ammoniumpersulfat	(17)
Antikörper, monoklonaler Antiphosphotyrosin AK 4G10	(4)
Anti-Maus Polyvalent IgG Peroxidasekonjugat	(23)
Avidin Meerrettich Peroxidasekonjugat	(5)
Benzamidin	(23)
Biociphos®	(27)
Biotinylierter Gel-Elektrophorese-Standard	(6)
Coomassie Brilliant Blau G 250	(22)
Deckgläser	(16)
Dialyseschlauch	(24)
Dulbecco phosphatet Buffer DPBS	(23)
EDTA	(17)
Einmalkanüle Microlance 3	(3)
Eisessig	(17)
Ethanol	(20)
Gewebekulturflaschen	(10)
Hoechst Farbstoff H33258	(20)
Hybond™ - C Hybridisation transfer membranes	(1)
Kaleidoskop Standard	(6)

---

L-Glutamin-Lösung 200mM	(23)
Methanol	(20)
Nutrient Mixture F10 Ham Hepes	(23)
Objektträger	(16)
Pasteur Kapillar Pipette	(25)
Penicillin/Streptomycin Lösung	(8)
Pertussistoxin	(23)
Ponceau S	(17)
Progesteron (4-Pregnen-3, 20 dion)	(23)
PSA-FITC (Pivum-sativum-Agglutinin-Fluoresceinisothiocyanat)	(23)
PVP (Polyvinylpyrolidone)	(23)
Reagenzglas Falcon® 2095	(3)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	(7)
Röntgenfilme X-OMAT AR	(15)
Röntgenfilmplatte für Mammographie MiMa	(9)
RPM 2106 ECL Western blotting detecting reagenz	(1)
Salzsäure	(17)
SDS (Natrium Dodecyl-Sulfat)	(23)
Temed (N,N,N',N' - Tetramethyldiamin)	(5)
Trasylol® (2)	
Tris/HCL (Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid)	(17)
Tween 20 (Polyoxyethylensorbent-Monolaurat)	(23)
Wasserstoffperoxid	(17)
Zählkammer nach Neubauer	(14)

### 2.1.3 Verwendete Puffer

#### Laufpuffer

190 mM Glycerin

0,1% w/v SDS

25 mM Tris/HCl

pH 8,3

#### Western Blot Puffer

250 mM Glycerin

0,01% w/v SDS

29% v/v Methanol

40 mM Tris/HCl

#### PBS

120 mM NaCl

4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

#### T-TBS Puffer

25 mM Tris Base

150 mM NaCl

0,1% v/v Tween 20, pH 7,4

#### Sammelgelpuffer

0,2% w/v SDS

750 mM Tris/HCl

pH 6,8

#### Trenngelpuffer

0,2% w/v SDS

750 mM Tris/HCl

pH 8,8

#### Sammelgel 6%ig

1,33 ml 30% w/v Acrylamid

3,33 ml Sammelgelpuffer

---

1,92 ml Aqua dest.

25 µl Temed

50 µl 12,5% w/v Ammoniumpersulfatlösung

#### Trenngel 12,5%ig

5,25 ml 30% w/v Acrylamid

6,2 ml Trenngelpuffer

950 µl Aqua dest.

25 µl Temed

50 µl 12,5% w/v Ammoniumpersulfatlösung

#### Coomassie-Blau-Färbelösung

0,25% w/v Coomassie-Blau

10% v/v Eisessig

45% v/v Methanol

45% v/v Aqua dest.

#### Proteasehemmstoff-Cocktail

1 mM EDTA

10 mM Benzamidin

2 mM DTT

0,2 mM PMSF

#### PTX-Lösungspuffer

50% Glycerol

50 mM Tris/HCl

10 mM Glycin

0,5 M NaCl

pH 7,5

#### HAM's F-10 Kulturmedium

1L Nutrient Mixture F-10 HAM

5ml L-Glutamin-Lösung 200mM

1% v/v Penicillin/Streptomycin-Lösung

---

0,3% w/v Rinderserumalbumin Fraktion V

pH 7,4

Anschließend wurde das Medium gefiltert (Porengröße: 0,2 micron) und bei 4°C aufbewahrt. Es wurde innerhalb von 24h verbraucht.

#### SpTALP Kulturmedium

100 mM Na Cl

3,1 mM KCl

0,3 mM Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

21,6 mM Na Lactat

0,4 mM Mg Cl<sub>2</sub> ( 6 H<sub>2</sub>O)

40 mM HEPES

0,4 mM EDTA

2 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM Na HCO<sub>3</sub>

1 mM Pyruvat

1mg/ml PVA

Penicillin/Streptomycin Lösung 1/500 (v/v)

pH7,4 - 7,45 RT

#### BSA-Präparation

Eine 10%ige Vorverdünnung w/v BSA wurde mit F10 Ham HEPES auf 3%v/v verdünnt und in Eppendorfreaktionsgefäßen zu je 500µl portioniert und bei -20°C gelagert.

Für jeden Versuch wurden 500µl im Trockenschrank aufgetaut (39°C) und 1/10 mit F10 Ham HEPES auf final 0,3% (v/v) verdünnt (Kapazitationsmedium).

#### Progesteron Stock-Lösung

Es wurden 3,145mg P4 abgewogen und in 2ml DMSO gelöst. Die 5mM Lösung wurde zu je 20µl bei -20°C eingefroren.

Für jeden Versuch wurden 20µl aufgetaut und entsprechend der benötigten Verdünnung mit F10 Ham Hepes weiterverdünnt.

---

### 2.1.4 Geräte

Axioskop mit Fotoeinheit MC 80	(26)
CO <sub>2</sub> Inkubator, Typ BB6060	(11)
Gelkammer Mini Protean II™	(6)
IKA Schüttler MTS 4	(12)
IKAMAG® RET Magnetrührer	(12)
Mikroskopfilter: (H33258) Filterset 02, (FITC) Filterset 09	(26)
Minifuge FR, Rotor BS4402/A	(11)
Power Supply 1000/500™	(6)
Suprafuge 22 Rotor HFA 22.50	(11)
Trockenschrank	(13)
Digital-pH-Meter 761 Calimatic (Knick GmbH & Co, Berlin)	
Phillips 201 G Transmissionselektronenmikroskop	(19)

### 2.1.5 Eingesetzte Peptide

Die Peptide wurden synthetisiert und hergestellt nach der Merrifield solid phase Methode (Barany et al., 1979) und anschließend HPLC gereinigt [in Zusammenarbeit mit dem Zentralinstitut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg (Dr. Brüller, Dr. Krause)].

### 2.1.6 Kryokonservierte Spermatozoen

Die verwendeten Ejakulate stammten von geschlechtsreifen 14-16 Monate alten „schwarzbunten Holstein Bullen“. Aufbereitet und kryokonserviert wurden sie in der Zucht- und Besamungsunion Hessen eG (Dr. F. Müller-Schlösser).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Aufbereitung der Spermatozoen**

#### **2.2.1.1 Kryokonservierung boviner Spermatozoen**

Als Ausgangsmaterial wurden kryokonservierte Ejakulate von Bullen (schwarz-bunter Holstein Bulle) der Zucht- und Besamungsunion Hessen e.G. verwendet.

Nach dem Absamen wurden die Ejakulate in der Besamungsstation auf eine Konzentration von 100 Millionen Spermatozoen/ml mit den entsprechenden Verdünnern Triladyl® und Biociphos® verdünnt und in routinemäßig konfektionierten Mini-Pailletten (0,25ml Cassou®) zu je 200µl kryokonserviert (20 Millionen Spermatozoen/Paillette). Die Vorverdünnung der Frischejakulate erfolgte im Verhältnis 1+1 bei einer Wasserbad-Temperatur von 32°C, die Endverdünnung und Konfektionierung bei Raumtemperatur (20°C). Anschließend wurden die Spermatozoen für zweieinhalb Stunden bei 5°C adaptiert und mittels eines Einfrierautomaten eingefroren.

Untersucht wurden sowohl in Triladyl® als auch in Biociphos® kryokonservierte Spermatozoen (Hinsch, 1997). Triladyl® wird im Unterschied zu Biociphos® Hühner-Eidotter als Kryoprotektivum hinzugegeben.

Biociphos®, ein neu konzipierter eidotterfreier Verdünner, enthält pflanzliche Lecithine, die aus Sojabohnenextrakt gewonnen werden.

Die kryokonservierten Pailletten wurden in einem 38°C warmen Wasserbad über eine Zeitdauer von 30s bei leichter Bewegung aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt der Pailletten zum Waschen in ein Falconröhrchen überführt. In Abhängigkeit von der Fragestellung wurden je nach benötigter Materialmenge 1 oder mehrere Pailletten vereinigt.

#### **2.2.2 Kapazitation frischer boviner Spermatozoen**

Die Kapazitation ist ein Reifungsprozess durch den die Spermatozoen so verändert werden, dass sie eine Eizelle befruchten können. In dem folgenden Versuchsansatz wurden bovine

---

Spermatozoen aus einem frischen Ejakulat (360 Mio. Spermatozoen/ml) in 4 verschiedenen Ansätzen kapazitiert.

1. Kapazitation in SpTALP + Heparin (1mg/ml)
2. Kapazitation in F 10 Ham Hepes + 0,3% BSA
3. Kapazitation in F 10 Ham + 0,3% BSA
4. Kapazitation in F 10 Ham + 1% BSA

Zunächst wurden jeweils 500µl des bovinen Ejakulates zweimal in je 1ml des entsprechenden Kapazitationsmediums bei 300 x g über 10min gewaschen. Nach Beendigung der zweiten Zentrifugation wurden die Sedimente mit dem jeweiligen Kapazitationsmedium in einem Volumen von 2,5ml resuspendiert (40 Mio. Spermatozoen/ml). Anschließend wurden von jedem Ansatz 7 x 300µl auf je 7 Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Für den Nullwert (keine Kapazitation) wurde sofort in das jeweils erste Eppendorfreaktionsgefäß 1ml PBS + 1ml Proteasehemmstoff-Cocktail pipettiert und zentrifugiert (Minifuge FR, 13000 upm, 3min). Der Überstand wurde abpipettiert und die Sedimente (ca. 50µl) mit jeweils 25µl Probenpuffer nach Laemmli 4fach + 25µl aqua dest. versetzt. Die so behandelten Proteingemische wurden jeweils 5min erhitzt (95°C) und dann mit 6000 upm (Minifuge FR) abzentrifugiert. Ebenso wurde mit den Proben nach 15min, 30min und nach 1h, 2h, 3h, 4h verfahren. Die Proteinextrakte der kapazitierten Spermatozoen wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die gelösten Spermatozoenproteine wurden nach einer Auftrennung der Polypeptide nach ihren Molekularmassen (SDS-PAGE) anschließend einem Westernblot und Immunoblot zugeführt.

### **2.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die nach den unterschiedlichen Protokollen kapazitierten Spermatozoen Proteingemische wurden durch eine diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Hierzu wurden Minigele, bestehend aus einem 6%igem Sammelgel und einem 12,5%igem Trenngel, gegossen. Zwischen zwei mit Isopropanol entfetteten Glasplatten wurden zwei

---

Distanzstäbe (Spacer, 0,75mm) eingelegt und in einer Kartusche fixiert. Diese wurde in einen Ständer mit Gummiboden eingespannt, um den unteren Spalt abzudichten. Nach Einfüllen des Trenngels in den Zwischenraum, den die beiden Glasplatten bildeten, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Abmessungen des Trenngels betragen 6 x 9 cm. Nach 45minütiger Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und ein Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Ein Gelkamm (10 Taschen, 0,75mm dick) wurde in das noch flüssige Sammelgel zwischen die Glasplatten geschoben und nach 30min Polymerisation wieder entfernt. Das Gel wurde dann in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet.

Die im Probenpuffer extrahierten Proteine (jeweils 50µl Proteinextrakt + 25µl Probenpuffer 4fach nach Laemmli + 25µl aqua dest.) wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Farbfront wurde von dem roten Farbstoff Pyronin Y gebildet, der dem Probenpuffer beigemischt war. Der „Kaleidoskop Broad Range Proteinstandard“ (Bio-Rad) sowie ein biotinylierter Standard (Bio-Rad) wurden als Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Die Elektrophorese wurde für 45min bei einer konstanten Spannung von 200V in einer Elektrophoresekammer (Mini Protean II von Bio-Rad) bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch auf Nitrozellulosemembranen geblottet.

### **2.2.2.2 Westernblot**

In einem Westernblot wurden die in der SDS-Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen getrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert (Towbin et al. 1979). Dazu wurde das Polyacrylamidgel blasenfrei auf eine feuchte Nitrozellulosemembran gelegt, mit zwei feuchten Filterpappen umgeben und zwischen zwei Schaumstoffscheiben gelegt. Diese wurden zwischen zwei Kunststoffplatten gepresst und in eine Westernblot-Kammer (Bio-Rad) eingelegt. Nach dem Elektrotransfer (90min, 35V pro Gel) wurden die Nitrozellulosemembranen entnommen, getrocknet und anschließend mit Ponceau S 10min lang gefärbt. Nach dem Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes mit Aqua dest. konnte ein regelrechter Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran überprüft werden.

---

Um festzustellen, ob die aufgetrennten Proteine quantitativ aus dem Polyacrylamidgel eluiert worden waren, wurden die eventuell im Gel verbliebenen Proteine zur Kontrolle mit Coomassie-Blau gefärbt.

### **2.2.2.3 Immunbiochemische Identifizierung von Proteinen**

Die Nitrozellulosemembranen mit den darauf befindlichen Proteinen wurden zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen in T-TBS mit 5% w/v Teleostgelatine für 1h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Antiphosphotyrosin Antikörper 4G10 verdünnt in T-TBS, (f.c. 1/1000). Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Nitrozellulosemembranen 3 mal für 5min in T-TBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation in T-TBS mit 5% w/v Teleostgelatine für eine Stunde.

Zur Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte dann eine 30-minütige Inkubation mit dem 1/3000 in T-TBS Puffer verdünnten mit Peroxidase markierten Zweitantikörper (Anti-Maus Polyvalent PO Ak). Abschließend wurden die Nitrozellulosemembranen wieder gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen (10 x 10 min in T-TBS Puffer auf dem Schüttler bei RT).

### **2.2.2.4 Chemilumineszenz**

Zum Nachweis spezifisch gebundener Antiphosphotyrosin-Antikörper diente das Chemilumineszenz-Verfahren. Das Substrat ECL (Amersham) wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Die Komponenten des Substrates enthalten eine Wasserstoffperoxidlösung und ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol). Die Nitrozellulosemembranen wurden für 1min mit diesem Substrat überschichtet. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen in Klarsichtfolie verpackt und auf geeignetes Filmmaterial (Fuji Röntgenfilmpplatten, Kodak Röntgenfilm X-OMAT AR) aufgelegt. Die Röntgenfilme wurden je nach Intensität der Reaktion zwischen 1min und 90min belichtet und abschließend entwickelt und fixiert.

### **2.2.3 Beurteilung der Vitalität und des akrosomalen Status boviner Spermatozoen**

Zur Bestimmung des akrosomalen Status von bovinen Spermatozoen wurde der kombinierte PSA-FITC/Hoechst 33258 Test angewandt (Cross & Overstreet, 1987; Cross & Meizel, 1989). Die im Folgenden beschriebene Färbung wurde sowohl an kryokonservierten Spermatozoen als auch an Spermatozoen aus frischen bovinen Ejakulaten durchgeführt.

#### Vitalitätsbestimmung der Samenzellen

Die Bestimmung der Anzahl lebender und toter Spermatozoen erfolgt durch den Fluoreszenzfarbstoff bis-Benzimide 33258 (Hoechst 33258). Dieser Farbstoff kann im Gegensatz zu vitalen Spermatozoen die nicht intakten Membranen toter Zellen permeieren, in den Zellkern eindringen und dort irreversibel an die im Spermatozoenkopf befindliche DNA binden. Avitale Spermatozoenköpfe werden durch die leuchtend blau fluoreszierende Chemikalie markiert (Gundersen & Shapiro, 1984; Hinsch et al., 1997).

Der Farbstoff Hoechst 33258 wurde in DPBS gelöst (1µg/ml f.c.) und 10min lang mit den Spermatozoen in Suspension (ca. 100µl) bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (Abb.10). Die Samenzellen wurden zweimal durch Zentrifugation (5min, 900 x g) in F10 Ham Hepes 4ml gewaschen, um freien Farbstoff zu entfernen. Nach der Sedimentation wurde der Überstand bis auf ein Restvolumen von ca. 50µl abpipettiert. 30µl der so behandelten Spermatozoensuspension wurden auf einem vorbereiteten Objektträger (mit Ethanol 96% gereinigt) ausgestrichen und unter Lichtausschluss bei 39°C ca. 30min getrocknet.

Zur Fixation wurden die Objektträger 30s in Methanol getaucht (Abb.10) und anschließend im Wasserbad 2 min gewaschen; (4 x 30s). Im Anschluss wurden die Objektträger wiederum unter Lichtausschluss ca. 15min getrocknet (39°C).

### Bestimmung des akrosomalen Status durch Pisum sativum-Agglutinin (PSA)

Die Verwendung von Lektinen zur Markierung der akrosomalen Region geht auf Arbeiten von Talbot & Chacon (1980) zurück und wurde durch Cross et al. (1986) modifiziert.

Das intakte Akrosom des Spermatozoonkopfes enthält Glykoproteine. Pisum Sativum Agglutinin (PSA) kann an diese akrosomalen Glykoproteine binden. Voraussetzung ist die vorherige Membranpermeabilisierung. Durch die Kombination von PSA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorezeinisothiozyanat (FITC), ist es möglich diese Bindung mittels eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar zu machen.

Es wurde 2mg PSA-FITC in DPBS gelöst (600µg/ml), zu je 50µl portioniert und bei -20°C eingefroren. Pro Versuchsansatz wurden 50µl PSA-FITC aufgetaut und mit 950µl DPBS auf eine finale Konzentration von 30µg/ml verdünnt.

Die durch die Methanolfixation membran-permeabilisierter Spermatozoen wurden dann mit 25µl PSA-FITC überschichtet, mit einem Deckgläschen abgedeckt und 30min unter Lichtausschluss inkubiert (Abb.10) . Anschließend wurde das Deckgläschen vorsichtig abgestreift, und die Objektträger wurden erneut 5min in ein Wasserbad mit fließendem Wasser gestellt. Nach Trocknung der Objektträger (15min, 39°C) wurden die Spermatozoen mit einem Spezialmedium (Citifluor®) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

Direkt anschließend erfolgte die Beurteilung der Fluoreszenzmarkierung unter einem mit entsprechenden Filtern ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop (H33258 Filterset 02: Emission 480nm, Excitation 365nm; PSA-FITC Filterset 09: Emission 525nm, Excitation 490nm, Firma Zeiss).

Routinemäßig wurden nach Beurteilung der Färbequalität 200 Spermatozoen pro Objektträger ausgewertet.

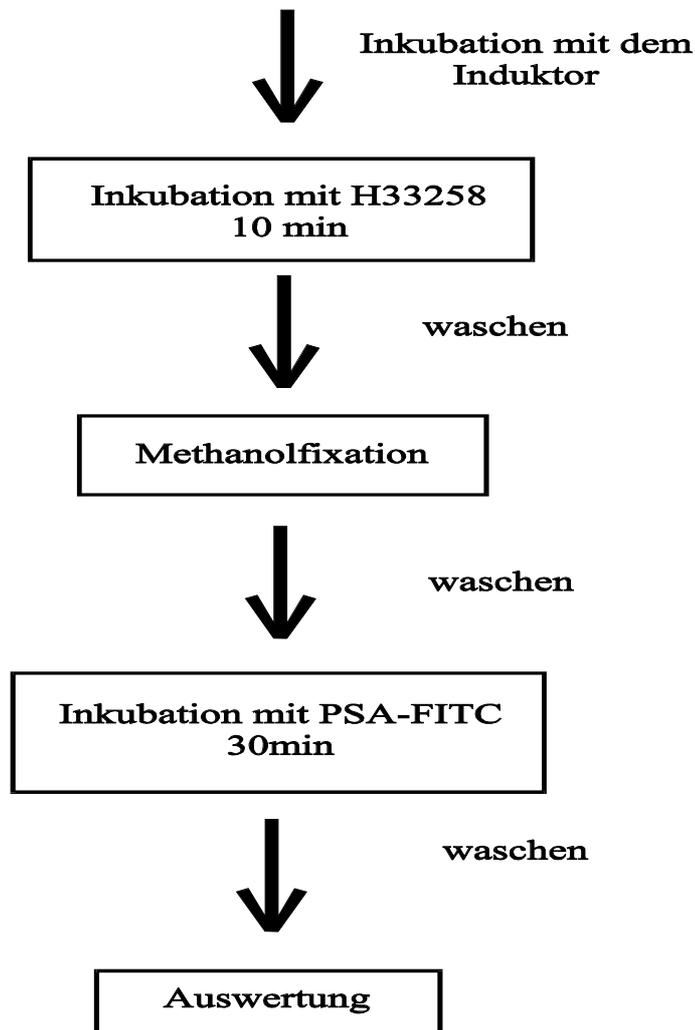


Abb. 10

*Flussdiagramm zum Färbeverfahren boviner Spermatozoen mit H33258 und PSA-FITC.*

Durch die kombinierte Anwendung beider Farbstoffe können Spermatozoen mit einer unphysiologischen Akrosomreaktion (tote akrosomreagierte Spermatozoen) und einer physiologischen Akrosomreaktion (lebende akrosomreagierte Spermatozoen) voneinander unterschieden werden.

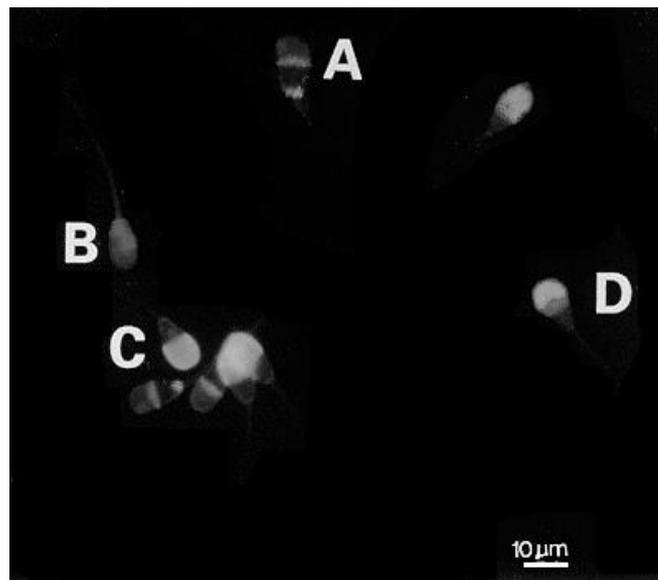


Abb. 11

Das Foto zeigt einen Ausstrich von bovinen mit H33258 und PSA-FITC markierten Spermatozoen. (Vergrößerung x 1000)

A: akrosomreagiert/lebend B: akrosomreagiert/tot C: akrosomintakt/lebend D: akrosomintakt/tot

### 2.2.3.1 Auswertungskriterien (FITC-PSA und H33258)

Wie in Abb. 12 gezeigt wurden die Spermatozoen als tot definiert, die im Kopfbereich überwiegend blau markiert erschienen. Als lebend (L) wurden alle Spermatozoen gewertet, die keine Blaufärbung aufwiesen, ebenso auch Spermatozoen, die im Bereich des Schwanzansatzes geringgradig blau gefärbt waren.

Als akrosomintakt (AI) wurden Spermatozoen definiert, die in den oberen zwei Dritteln des Kopfes homogen grün-gelb gefärbt waren. Akrosomreagierte (AR) Spermatozoen zeigten im Bereich des Akrosoms keine Fluoreszenz. Ebenso wurden Spermatozoen als akrosomreagiert (AR) bewertet, die nur im Bereich des äquatoriellen Bandes ein grün-gelbes Fluoreszenzmuster zeigten. Auch Spermatozoen, deren akrosomaler Bereich fleckenartig („patchy pattern“) angefärbt war, wurden als akrosomreagiert (AR) beurteilt.

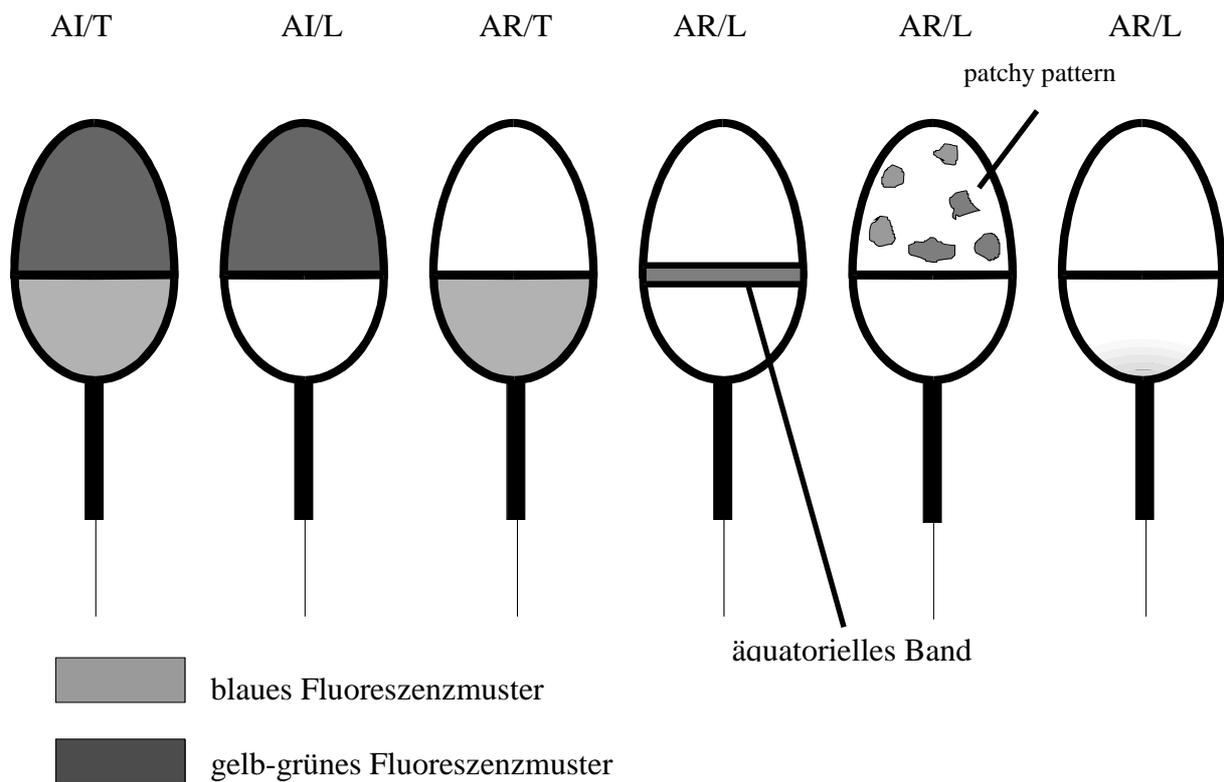


Abb. 12

*Schematische Darstellung der unterschiedlichen Fluoreszenzfärbemuster boviner Spermatozoen und ihre Bewertung. L: lebend, T: tot, AR: akrosomreagiert, AI: akrosomintakt*

#### 2.2.4 Induktion der Akrosomreaktion durch physiologische Induktoren

Die Induzierbarkeit der akrosomalen Exozytose wurde mit physiologischen Induktoren untersucht und mit den unter Punkt 2.2.3 beschriebenem Färbeverfahren gemessen. In allen im Folgenden beschriebenen Versuchen wurden kryokonservierte bovine Spermatozoen verwendet.

Je nach benötigter Spermatozoenkonzentration wurden 1-2 Pailletten pro Falconröhrchen (15ml) aufgetaut und vereinigt, mit 6ml F10 Ham Hepes (39°C) überschichtet und zweimal 10min mit 300 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Abb. 13).

Nach der ersten Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 1ml abgezogen und verworfen. Anschließend wurde das Sediment wieder mit 5ml F10 Ham Hepes überschichtet und resuspendiert.

Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vorsichtig bis unmittelbar über das entstandene Sediment abgezogen und verworfen. Anschließend wurde dieses mit 600µl

auf 39°C vorgewärmten Kapazitationsmedium resuspendiert (F10 Ham Hepes + 0,3% BSA Fraktion V; no. 4503). Die Spermatozoensuspension wurde zu je ca. 100µl auf vorbereitete Eppendorfreaktionsgefäße verteilt und 4h bei 39°C und 5% CO<sub>2</sub> kapazitiert.

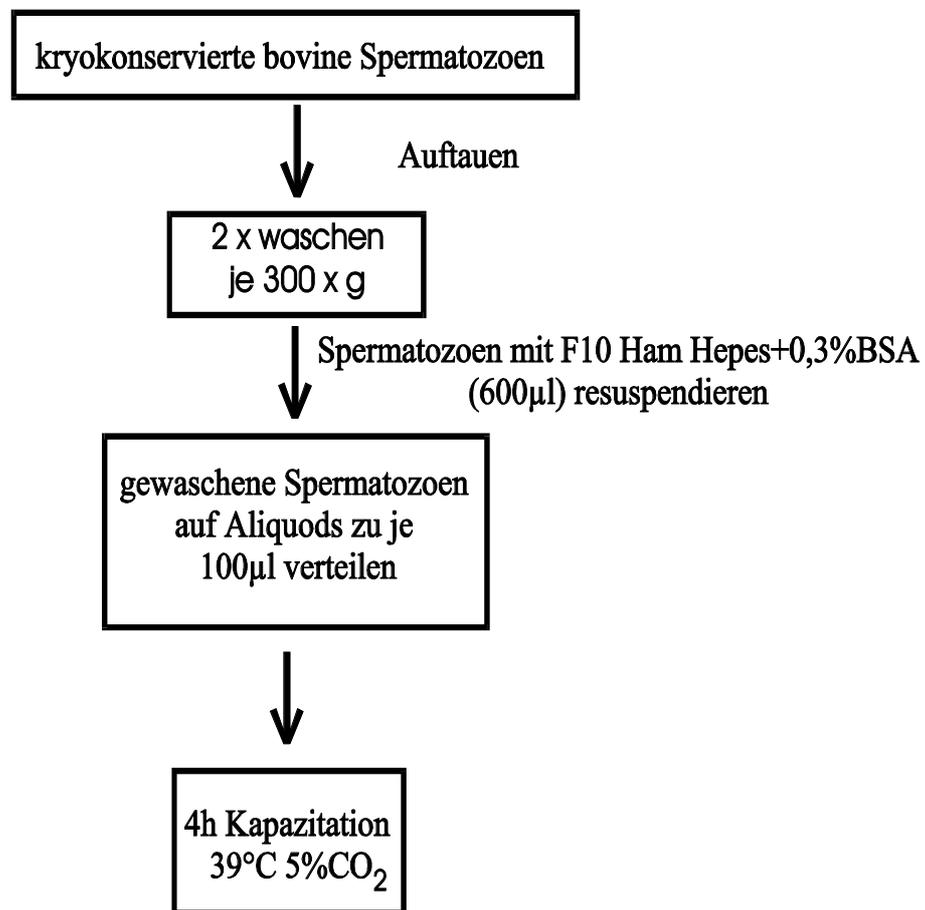


Abb. 13

*Flussdiagramm zur Veranschaulichung der Kapazitation kryokonservierter boviner Spermatozoen.*

#### Kapazitation über das Swim-up-Verfahren

Zur Isolation progressiv motiler Samenzellen bei gleichzeitiger Kapazitation wurden aufgetaute kryokonservierte Spermatozoen dem Swim-up-Verfahren unterzogen. Das Herauswaschen des Kryoprotektivums erfolgte wie oben beschrieben. Nach der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand bis knapp über das Sediment abgezogen und verworfen. Das Sediment wurde mit auf 39°C vorgewärmtem Kapazitationsmedium vorsichtig überschichtet (F10 Ham Hepes + 0,3% BSA Fraktion V; no. 4503). Zur Kapazitation und zum

Aufschwimmen der motilen Spermatozoen wurden die Proben bei 39°C und 5%CO<sub>2</sub> für 3h inkubiert. Danach wurde der Überstand mit den progressiv motilen Spermatozoen abgezogen, vereinigt und auf die vorbereiteten Eppendorfreaktionsgefäße verteilt (finales Volumen, betrug 100µl, Spermatozoenkonzentration: ca. 2 x 10<sup>6</sup>/ml). Die in den Eppendorfreaktionsgefäßen befindlichen Spermatozoen wurden eine weitere Stunde bei 39°C inkubiert, so dass eine gesamte Kapazitationsdauer von insgesamt 4h erreicht wurde.

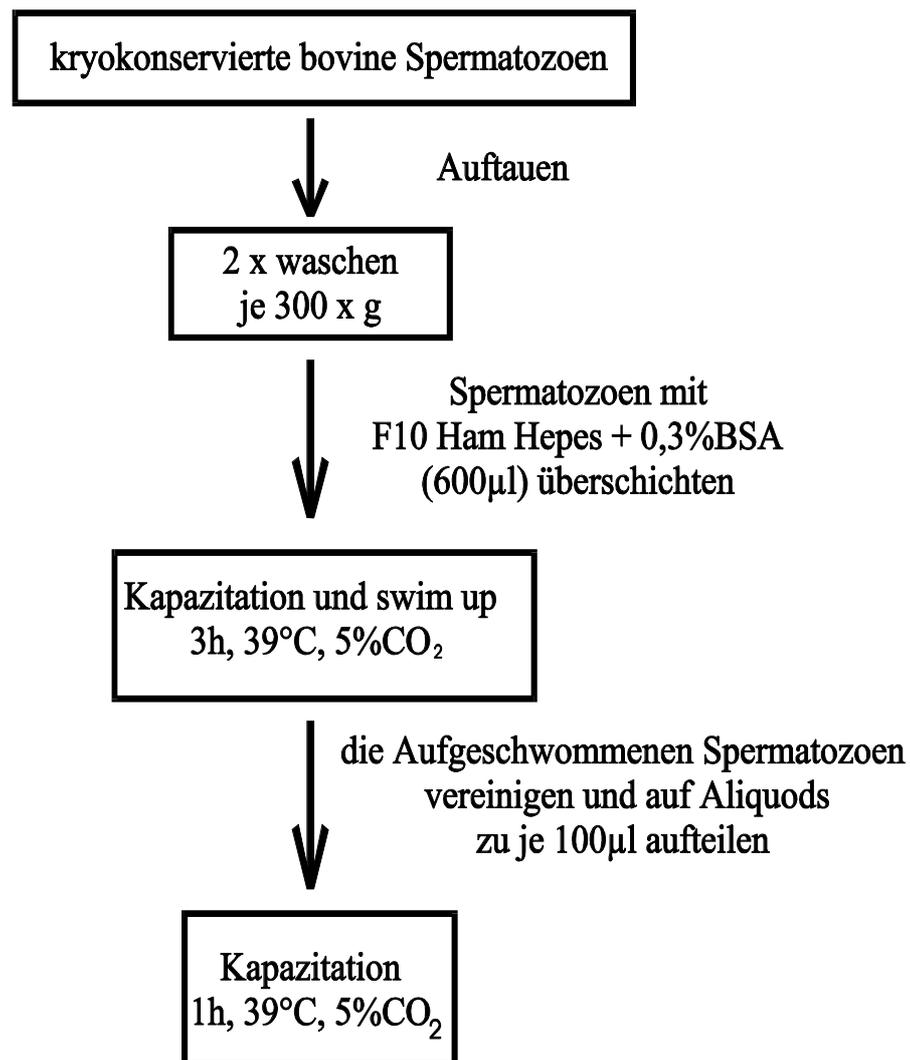


Abb. 14

*Flussdiagramm der mittels Swim-up-Verfahren kapazitierten kryokonservierten bovinen Spermatozoen.*

#### 2.2.4.1 Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron

Kapazitierte Spermatozoen wurden zu jeweils 80µl (Abb.13) auf Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Zur Ermittlung der Dosisabhängigkeit der Induktion der Akrosomreaktion durch

Progesteron wurden verschiedene Progesteron-Konzentrationen nach folgendem Schema hinzupipettiert.

Tab. 2

*Pipettierschema zur Erstellung der unterschiedlichen Progesteronkonzentrationen (f.c., finale Konzentration).*

P4 fc.	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	0,001 $\mu$ M
$\mu$ l Spermatozoen	80	98	80	80
$\mu$ l 50 $\mu$ M P4	20	2		
$\mu$ l 0,5 $\mu$ M P4			20	
$\mu$ l 0,005 $\mu$ M P4				20

Die Proben wurden bei 39°C und 5% CO<sub>2</sub> für 15min inkubiert. Anschließend wurde die Färbung mit H33258 und PSA-FITC wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt.

Es wurden 200 Spermatozoen pro Objektträger entsprechend ihres Färbemusters ausgewertet.

#### **2.2.4.1.1 Zeitabhängigkeit der Progesteroninduktion**

Kryokonservierte Spermatozoen wurden wie oben beschrieben über 4h kapazitiert (Abb. 13, 14).

Als Kontrolle wurde jeweils die Rate der spontan akrosomreagierten Spermatozoen nach 4 Stunden Kapazitation + 1min, 5min oder 15min gemessen.

In drei weiteren Messungen wurde die Anzahl lebender akrosomreagierter Spermatozoen nach einer 1-, 5-, und 15-minütigen Inkubation mit Progesteron (f.c. 1 $\mu$ M) ausgewertet.

Zum Abbruch der Progesteron-Inkubation wurden die Spermatozoensuspensionen jeweils in einem Falconröhrchen mit 4ml PVP 2% (w/v) DPBS zweimal für je 10min gewaschen (900xg). Die Färbung wurde wie in Abb. 10 beschrieben durchgeführt.

#### **2.2.4.2 Induktion der Akrosomreaktion durch synthetische ZP3-Peptide**

Nach dem unten beschriebenen Pipettierschema wurden in F10 Ham Hepes verdünnte 10 $\mu$ M Peptidlösungen hergestellt.

*Pipettierschema:*

ZP3-1: 8µl (1mg/ml, 606µM)	+	492µl F10 Ham Hepes ⇒ 10µM
ZP3-2: 10µl (1mg/ml, 478µM)	+	490µl F10 Ham Hepes ⇒ 10µM
ZP3-3: 12µl (1mg/ml, 432µM)	+	488µl F10 Ham Hepes ⇒ 10µM
ZP3-4: 8µl (1mg/ml, 606µM)	+	492µl F10 Ham Hepes ⇒ 10µM
ZP3-5: 8µl (1mg/ml, 649µM)	+	492µl F10 Ham Hepes ⇒ 10µM
ZP3-6: 6µl (1mg/ml, 909µM)	+	494µl F10 Ham Hepes ⇒ 10µM
ZP3-7: 8µl (1mg/ml, 649µM)	+	492µl F10 Ham Hepes ⇒ 10µM
ZP3-8: 8µl (1mg/ml, 649µM)	+	492µl F10 Ham Hepes ⇒ 10µM

Die so hergestellten Peptidlösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und für das jeweilige Experiment aufgetaut. Da es keinen quantitativen Unterschied zwischen frisch gelöstem und aufgetautem Peptid gab (Voruntersuchungen nicht gezeigt), wurden die Verdünnungen wiederholt verwendet.

Wie oben beschrieben wurden jeweils 2 Pailletten kryokonservierter boviner Spermatozoen gewaschen und entweder mit oder ohne das Swim-up-Verfahren kapazitiert (Abb. 13, 14).

Zum Testen der Induktionsfähigkeit der Peptide wurden je 10µl Peptidlösung v/v zu 90µl kapazitierten Spermatozoen hinzupipettiert (f.c.1µM) und 15min bei  $39^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Abschließend wurde die Färbung mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen H33258 und PSA-FITC durchgeführt (Abb. 10).

Als Positivkontrolle wurde die Akrosomreaktion durch 1µM f.c. Progesteron induziert und ausgewertet.

Als Negativkontrolle diente die Bestimmung der spontan akrosomreagierten, lebenden Spermatozoen ohne Zugabe eines Induktors.

### **2.2.4.2.1 Dosisabhängigkeit der durch ZP3-6 induzierten akrosomalen Reaktion**

Je nach Anzahl der Einzelerperimente wurden 2 oder mehr Pailletten in Biociphos® kryokonservierte bovine Spermatozoen verwendet.

Die Konzentration der Spermatozoen wurde, nachdem sie zweimal zum Herauswaschen des Kryoprotektivums zentrifugiert worden waren, in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Begleitend wurde in einer Makler Kammer mittels eines computergestützten Verfahrens (CASA-System) die Gesamtmotilität der Spermatozoen ermittelt.

Verwendet wurden ausschließlich Proben mit einer Konzentration von im Mittel  $25 \times 10^6$  Spermatozoen/ml und einer Gesamtmotilität von über 60%. Zur Induktion der Akrosomreaktion wurde das ZP3-6 Peptid eingesetzt. Die benötigten Peptidverdünnungen wurden mit F10 Ham Hepes hergestellt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

In einem ersten Versuchsansatz wurden die Spermatozoen ohne das Swim-up-Verfahren kapazitiert (Abb. 13).

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Spermatozoen einer durch das Swim-up-Verfahren modifizierten Kapazitation unterzogen (Abb. 14).

Hinsichtlich der Induktion der Akrosomreaktion und der abschließenden Auswertung (H33258, PSA-FITC) wurden die Proben identisch behandelt.

Zur Induktion der Akrosomreaktion wurden die Spermatozoen jeweils 25min mit der entsprechenden Peptidverdünnung inkubiert, wobei während der letzten 10min zusätzlich  $1\mu\text{l}$  Hoechst H33258 Farbstoff ( $1\mu\text{g/ml}$  f.c.) hinzugesetzt wurde. Auch bei diesen Versuchen wurde vergleichend immer eine Negativkontrolle (ohne Peptidzusatz) und eine Positivkontrolle ( $1\mu\text{M}$  f.c. Progesteron) ausgewertet.

Als Kontrollpeptid wurde das ZP3-1 Peptid (mausspezifisch) eingesetzt.

### **2.2.4.3 Induktion der Akrosomreaktion mit Progesteron und ZP3-6 Peptid**

Um zu testen, ob durch eine gemeinsame Inkubation der Spermatozoen mit Progesteron (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) und ZP3-6 Peptid (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) der Anteil akrosomreagerter Spermatozoen erhöht werden konnte, wurden aufgetaute und gewaschene, mit dem Swim-up-Verfahren aufbereitete bovine

Spermatozoen, wie oben beschrieben kapazitiert (Abb. 14). Zur Induktion der Akrosomreaktion wurden Progesteron und ZP3-6 gleichzeitig für insgesamt 25min zu den kapazitierten Spermatozoen hinzupipettiert. Zum Vergleich wurden auch Spermatozoen, die jeweils mit nur einem Induktor induziert worden waren, sowie eine Negativkontrolle untersucht.

Zur Untersuchung der Fragestellung einer konsekutiven Induktion, wurden die nach einem swim-up gewonnenen kapazitierten Spermatozoen zuerst 5min mit Progesteron (f.c. 1 $\mu$ M) inkubiert und anschließend für weitere 20min mit dem ZP3-6 Peptid (f.c. 1 $\mu$ M). Für die letzten 10min der auch hier insgesamt 25minütigen Induktionszeit wurden die Spermatozoen mit dem Hoechst-Farbstoff H33258 versetzt. Danach wurden die Spermatozoen wiederum gewaschen, fixiert und mit PSA-FITC gefärbt und ausgewertet.

#### **2.2.4.4 Einfluss von Pertussistoxin (PTX) auf die Induktion der Akrosomreaktion**

Kryokonservierte bovine Spermatozoen wurden wie beschrieben gewaschen und nach dem Swim-up-Verfahren kapazitiert (Abb. 14). Nach Beendigung des swim-up (3h Kapazitation) wurden die Spermatozoen zu je 350 $\mu$ l in Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt. Das PTX wurde in dem oben beschriebenen Lösungspuffer auf eine Konzentration von 10 $\mu$ g/ml vorverdünnt. Verwendet wurde in der folgenden einstündigen Präinkubation PTX in Konzentrationen von 1 $\mu$ g/ml (f.c.) und 0,1 $\mu$ g/ml (f.c.). Damit wurde eine Kapazitationsdauer von insgesamt 4h (einschließlich einer einstündigen Inkubation mit PTX) erreicht (Abb. 15).

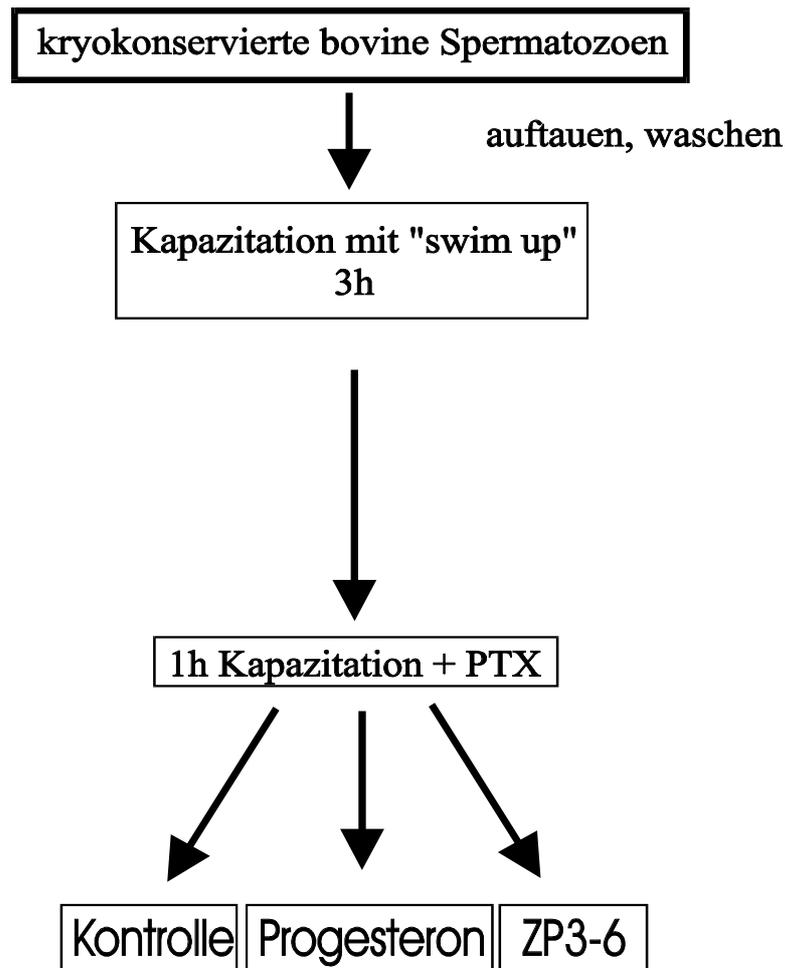


Abb. 15

Flussdiagramm zum Nachweis des Einflusses von Pertussistoxin (PTX) auf die mit ZP3-6 Peptid- und Progesteron-induzierte akrosomale Exozytose.

Als Negativkontrolle wurden die Spermatozoen (nach dem 3-stündigen swim-up) 1h mit PTX-Lösungspuffer präinkubiert und ausgewertet.

Zur Induktion der Akrosomreaktion wurden dann die mit PTX präinkubierten kapazitierten Spermatozoen so portioniert, dass jede Probe 100µl Spermatozoensuspension + Induktor enthielt. Die Inkubationsdauer mit dem jeweiligen Induktor betrug jeweils 25min, einschließlich der 10 minütigen Inkubation mit H33258.

Abschließend wurden die Spermatozoen wie oben beschrieben gewaschen mit PSA-FITC gefärbt und ausgewertet.

### 3 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die Prozentwerte mit Hilfe der Formel

$$\mu = \arcsin \sqrt{\frac{\%}{100}}$$

transformiert und mit dem Programm Graph Pad ® InStat2 analysiert. Verwendet wurde ein zweiseitiger Student-t Test. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) ging von keiner Beeinflussung der Akrosomreaktion aus. Bei einem  $p < 0,05$  für  $H_0$  wurde ein Effekt bezüglich der Akrosomreaktion angenommen ( $H_1$ , Alternativhypothese).

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Vergleich unterschiedlicher Kapazitationsmedien**

In dem folgenden Versuchsaufbau wurde der Einfluss vier verschiedener Medien auf die Tyrosinphosphorylierung frischer boviner Spermatozoen untersucht.

Die Proteinbestandteile der kapazitierten Spermatozoen wurden mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Molekularmassen elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe der mitgeführten Gel-Elektrophorese Standards konnten die Ponceau S-gefärbten Proteinbanden ihren apparenten Molekularmassen nach zugeordnet werden. Nach Einsatz von einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper Klon 4G10 wurden durch das Peroxidase-Chemilumineszenzverfahren im Immunoblot Proteine nachgewiesen, die phosphorylierte Tyrosinreste beinhalteten (Abb. 16)

In Abb. 16 A stellte sich eine breite, immunreaktive 80 kDa Bande nach 0, 15', 30', 1h, 2h, 3h und 4h dar. Schwächere Immunreaktionen zeigten sich im Bereich von 30, 35, 45 und 90 kDa. Unabhängig von der Kapazitationsdauer konnte nach Verwendung von SpTALP + Heparin als Kapazitationsmedium kein eindeutiger Unterschied im Phosphorylierungsmuster beobachtet werden.

In Abb. 16 B ist das Phosphorylierungsmuster boviner Spermatozoen nach der Kapazitation in F10 Ham Hepes + 0,3% BSA dargestellt. Nach 15min Kapazitation detektierte der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper schwach Proteine mit einer relativen Molekularmasse von 7,1 kDa. Nach 30min Kapazitationsdauer nahm die Intensität der Markierung der 7,1 kDa Proteine weiter zu. Die Proteine mit den relativen Molekularmassen von 30, 35, 45, 80 und 90 kDa erschienen dagegen unbeeinflusst von der Kapazitationszeit und zeigten ein weitgehend gleiches Phosphorylierungsmuster und ähnliche Intensität der Immunreaktion wie zum Zeitpunkt Null.

In Abb. 16 C dargestellt ist die Tyrosinphosphorylierung von Spermatozoenpräparationen, die in F10 Ham + 0,3% BSA kapazitiert worden waren. Eine starke Immunreaktion konnte zu allen beobachteten Kapazitationszeitpunkten im Bereich von Proteinen mit einer relativen Molekularmasse von 7,1, 35, 45, 80, und 88 kDa nachgewiesen werden. Eine geringgradige Zunahme der Intensität der Immunreaktion zeigten mit zunehmender Kapazitationsdauer Proteine mit einer apparenten Molekularmasse von 30, 32 und 35 kDa.

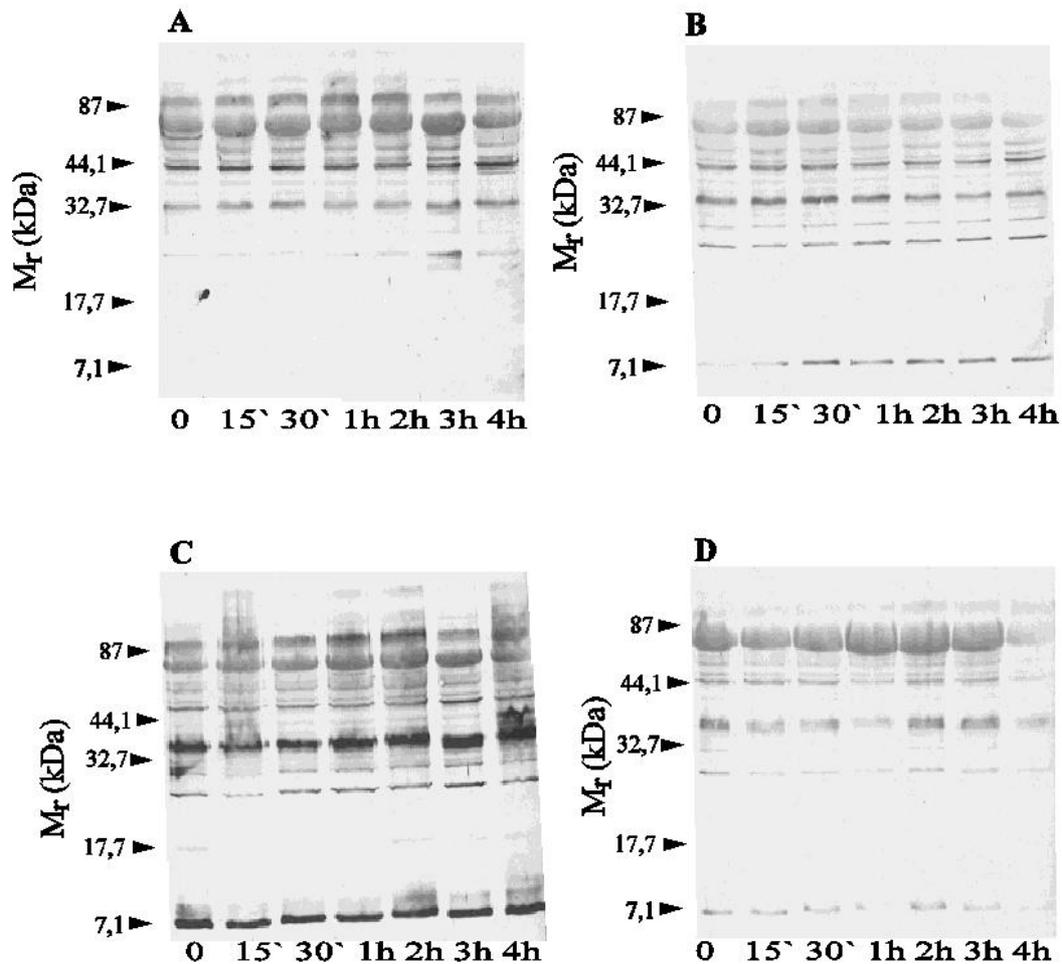


Abb. 16

*Tyrosinphosphorylierung von bovinen Spermatozoen-Proteinen nach 0, 15', 30', 1h, 2h, 3h und 4h Kapazitationsdauer. Es wurden vier verschiedene Kapazitationsansätze einander gegenüber gestellt. Im Immunoblot wurden phosphorylierte Proteine mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper Klon 4G10 (1:1000 verdünnt) markiert und im Chemilumineszenz-Verfahren dargestellt. Links sind die apparenten Molekularmassen des mitgeführten Proteinstandards in kDa aufgetragen. Jeweils ein typisches Experiment ist dargestellt.*

*A: SpTALP+Heparin, B: F10 Ham Hepes+0,3% BSA, C: F10 Ham+0,3% BSA, D: F10 Ham+1% BSA*

Die in Abb. 16 D dargestellte Immunreaktion zeigt die Tyrosinphosphorylierung von in F10 Ham + 1% BSA kapazitierten Spermatozoen. Zwei breite immunreaktive Banden kamen im Bereich von 80 und 40 kDa zu allen untersuchten Zeitpunkten zur Darstellung. Schwächere, aber scharf abgegrenzte Immunreaktionen, zeigten Proteine mit einer relativen

Molekularmasse von 7,1, 30, 32, 45, 50 und 60 kDa zu allen Beobachtungszeitpunkten. Damit unterschied sich das Phosphorylierungsmuster und die Intensität der Immunreaktion nach Kapazitation nicht von dem zum Zeitpunkt Null vorhandenen Phosphorylierungsmuster.

Zusammenfassend ließen sich mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper an den gelelektrophoretisch aufgetrennten Spermatozoen-Proteinen durch die Kapazitation in vier verschiedenen Medien nur geringgradige Änderungen der Tyrosinphosphorylierung darstellen. Die in F10 Ham Hepes + 0,3% BSA kapazitierten Spermatozoen zeigten eine mit zunehmender Kapazitationsdauer stärker werdende immunreaktive Bande im Bereich von Proteinen mit einer apparenten Molekularmasse von 7,1 kDa die nach 15 - 30min als Zunahme der Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine zu beobachten war. Eine geringgradige Zunahme der Intensität der Immunreaktion im Bereich von 30, 32 und 35 kDa über die Kapazitationsdauer wurde an den in F10 Ham + 0,3% BSA kapazitierten Spermatozoen beobachtet. An den in SpTALP + Heparin und in F10 Ham + 1% BSA kapazitierten Spermatozoen war keine Änderung bezüglich der Tyrosinphosphorylierung über die Kapazitationszeit nachweisbar.

## **4.2 Induktion der Akrosomreaktion boviner Spermatozoen**

### **4.2.1 Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron**

Die schon in anderen Tiermodellen beschriebene Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron wurde hier zum ersten mal an in Biocophos® kryokonservierten bovinen Spermatozoen untersucht (Cheng et al., 1998, Kay et al., 1994).

Eigene Vorarbeiten zeigten, dass DMSO als Lösungsgrundlage für P4, in Verdünnungen, wie sie bei der Induktion mit P4 eingesetzt wurden den akrosomalen Status nicht beeinflussten (nicht gezeigt).

Wie Abb. 17 zeigt, konnte durch die Induktion mit 1 $\mu$ M P4 (f.c.) der Anteil lebender akrosomreagerter Spermatozoen im Mittel von 12,5% auf 25% gesteigert werden.

Eine erste statistisch signifikante Induktion der Akrosomreaktion ( $p < 0,001$ ) war nach der Inkubation von 0,1 $\mu$ M P4 messbar. Niedrigere P4-Konzentrationen (0,001  $\mu$ M P4, 0,01 $\mu$ M P4) führten zu keinem statistisch signifikanten Anstieg ( $p > 0,05$ ) des Anteils lebender/akrosomreagerter Spermatozoen.

Durch die Verwendung einer höheren P4-Konzentration (10 $\mu$ M) konnte der Anteil der akrosomreagierten Spermatozoen gegenüber der Induktion mit 1 $\mu$ M P4 nicht statistisch signifikant ( $p>0,05$ ) weiter gesteigert werden (Abb. 17).

Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch im bovinen System die Akrosomreaktion an in Biociphos® kryokonservierten Spermatozoen dosisabhängig mit P4 induziert werden kann.

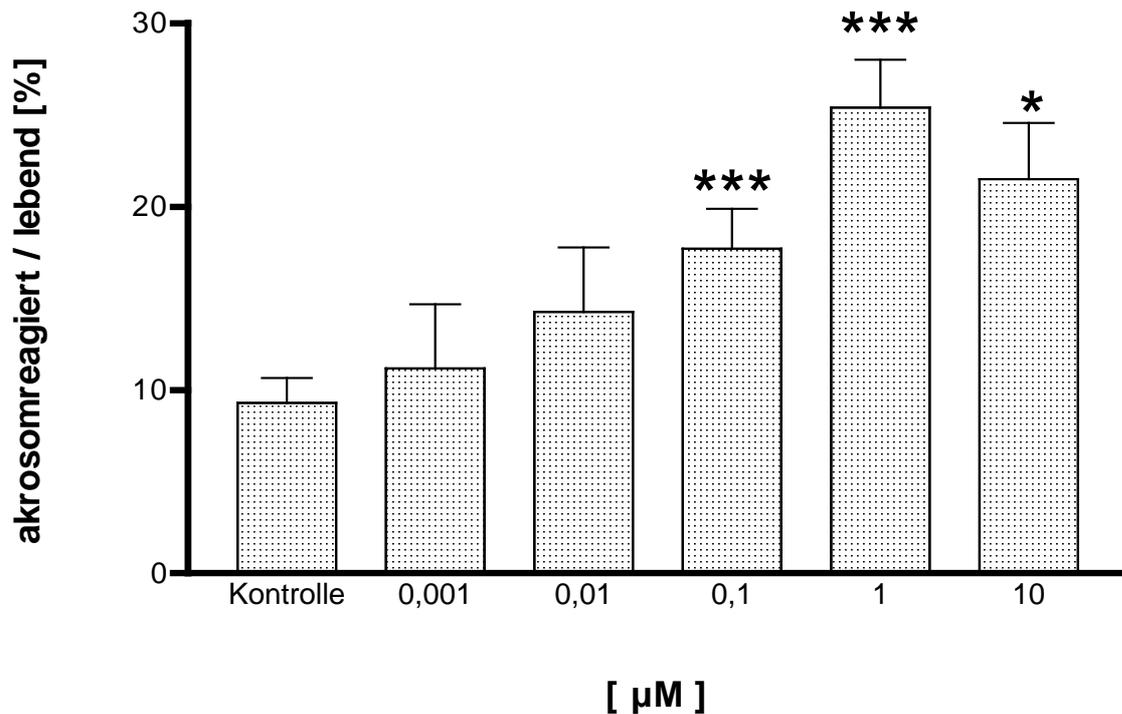


Abb. 17

*Induktion der Akrosomreaktion kryokonservierter boviner Spermatozoen mit unterschiedlichen P4-Konzentrationen. Auf der Abszisse sind die verwendeten P4-Konzentrationen und die unbehandelten Kontroll spermatozoen dargestellt. Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) angegeben. ☒☒☒  $P<0,001$ ; ☒  $P>0,05$ ;  $n=3-5$*

#### **4.2.1.1 Zeitabhängigkeit der Progesteroninduktion**

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob unterschiedlich lange Inkubationszeiten mit P4 die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion von bovinen Spermatozoen beeinflussen können.

Nach einer einminütigen Inkubation mit P4 (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) stieg der Anteil der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen von 11% (Kontrolle) auf 25% an. Nach einer fünfminütigen Inkubation mit P4 (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) wurde ein Anstieg von 9% (Kontrolle) auf 21% beobachtet. Nach fünfzehnminütiger Inkubation waren in der Kontrolle 14% der Spermatozoen spontan akrosomreagiert. Nach Inkubation mit P4 (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) war der Anteil der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen auf 26% angestiegen.

In der statistischen Analyse führten sowohl die einminütige, die fünfminütige als auch die fünfzehnminütige Induktion der Akrosomreaktion zu einem signifikanten Anstieg des Anteils lebender, akrosomreagierter Spermatozoen ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ). Eine Zeitabhängigkeit der 1min und 15min P4-Inkubation mit Veränderung des prozentualen Anteils akrosomreagierter Spermatozoen war nicht zu beobachten.

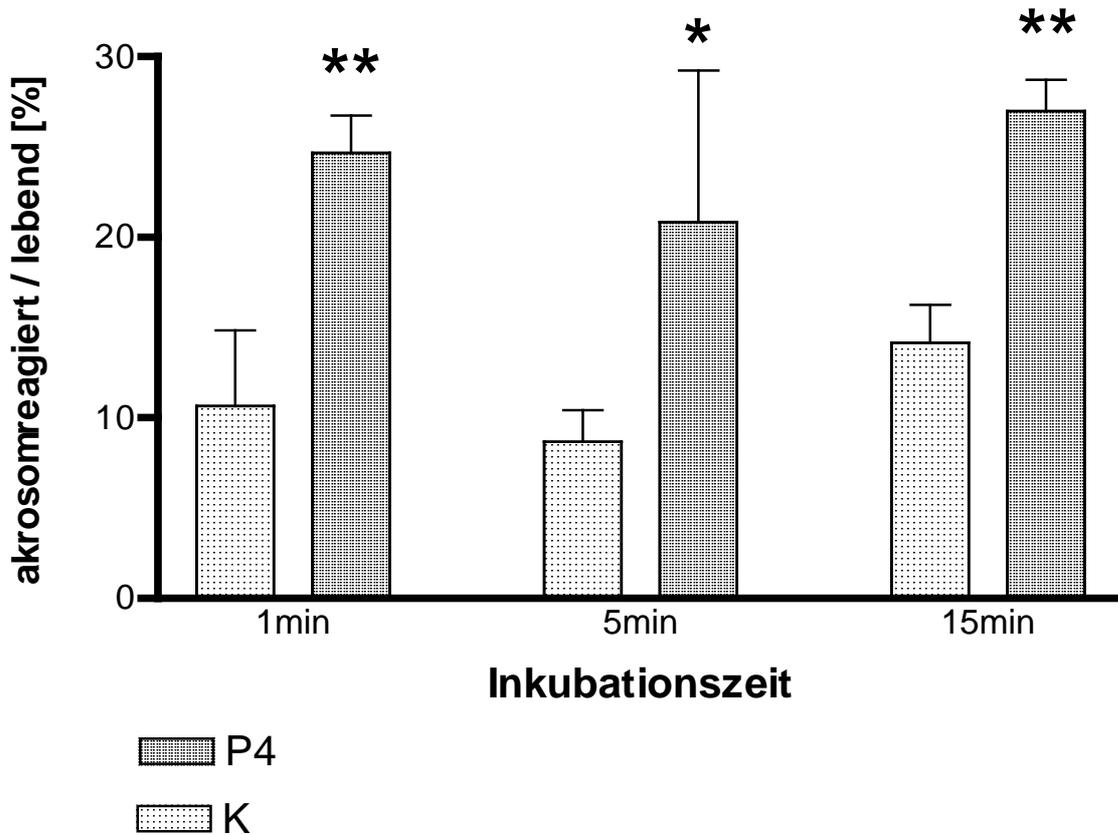


Abb. 18

*Zeitabhängigkeit der Induktion der Akrosomreaktion boviner kryokonservierter Spermatozoen mit P4 (f.c. 1 $\mu$ M). Auf der Abszisse sind die unbehandelten Kontrollspermatozoen (gepunktete Säule) den 1min, 5min und 15min in P4 inkubierten Spermatozoen (schraffierte Säulen) gegenübergestellt. Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit Standardabweichungen angegeben (K: Kontrolle, P4: Progesteron). ☒  $P < 0,05$ ; ☒☒  $P < 0,01$ ;  $n = 3$ .*

#### 4.2.2 Induktion der Akrosomreaktion durch synthetische ZP3 Peptide

In Tab. 3 sind die Aminosäuresequenzen der ZP3-Peptide zusammengestellt, die mit der Fragestellung getestet wurden, ob sie die akrosomale Exozytose induzieren können. Folgende Peptide wurden getestet:

1. speziesspezifische murine ZP3-Aminosäuresequenzabschnitte (Peptid: ZP3-1, ZP3-2, ZP3-3, ZP3-4 und ZP3-7) und ein humanspezifisches ZP3-Peptid (ZP3-8); diese Peptide

unterschieden sich deutlich hinsichtlich ihrer Primärstruktur von den ZP3-Proteinen anderer Spezies.

2. hoch konservierte, speziesübergreifende ZP3-Sequenzen (Peptid: ZP3-5, ZP3-6), deren Primärstruktur nahezu identisch in den ZP3 Proteinen mehrerer Spezies zu finden ist.

Tab. 3

*Auflistung der Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide im one letter code.*

<b>Peptid</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>Anzahl der Aminosäuren</b>	<b>Spezies</b>
<b>ZP3-1</b>	QTLWLLPGGTPVPG	15	Maus
<b>ZP3-2</b>	TPSPLDPNSSPYHFIVDF	19	Maus
<b>ZP3-3</b>	SSQFQIHGPRQWSKLVSRNRR	21	Maus
<b>ZP3-4</b>	TRKCHSSSYLVSLPY	15	Maus
<b>ZP3-5</b>	PIECRYPRQGNVSS	14	Konsensus
<b>ZP3-6</b>	DVTVGPLIFL	10	Konsensus
<b>ZP3-7</b>	CSNSSSSQFQIHGP	14	Maus
<b>ZP3-8</b>	CGTPSHSRRQPHVM	14	Mensch

#### **4.2.2.1 Dosisabhängigkeit der durch ZP3-6 induzierten akrosomalen Reaktion**

Es wurde überprüft, ob die synthetischen ZP3-Peptide einen funktionellen Einfluss auf die akrosomale Reaktion von kryokonservierten bovinen Spermatozoen haben. Die gewählte finale Konzentration der Peptide lag bei 1µM. Die Evaluierung der Bioaktivität der ZP3-Peptide nach einer 25-minütigen Inkubation mit den Test-Spermatozoen ergab, dass aus der Gruppe der eingesetzten Peptide nur zwei Peptide, das ZP3-5 Peptid und das ZP3-6 Peptid, die akrosomale Exozytose statistisch signifikant induzierten (Abb. 19). Diese Peptide spiegeln homologe Sequenzen im ZP3-Protein wider. Als Positivkontrolle diente P4, das in einer Konzentration von 1µM die Akrosomreaktion statistisch signifikant induzierte.

Wie in Abb. 19 gezeigt, blieb der prozentuale Anteil akrosomreagerter lebender Spermatozoen nach Inkubation mit den speziesspezifischen Peptiden ZP3-1, ZP3-2, ZP3-3, ZP3-4, ZP3-7 und ZP3-8 im Vergleich zur Negativkontrolle (Inkubation mit Puffer aber ohne Peptid) gleich.

Nach 25-minütiger Inkubation mit ZP3-6 Peptid stieg dagegen der Anteil akrosomreagerter lebender Spermatozoen von 8% auf 22% an. Das ZP3-5 Peptid induzierte die Akrosomreaktion in ihrem Ausmaß schwächer. Hier stieg der Anteil lebender akrosomreagerter Spermatozoen von 8% auf 15% an. Die statistische Auswertung zeigte, dass durch das ZP3-6 Peptid (f.c. 1µM) die Akrosomreaktion statistisch signifikant induziert werden konnte ( $P < 0,001$ ). Für die Induktion durch das ZP3-5 Peptid wurde eine eindeutige aber etwas niedrigerer Signifikanz von  $P < 0,05$  errechnet. Die statistische Auswertung führte zur Ablehnung der Nullhypothese und zeigte, dass die beiden hochkonservierten ZP3-Peptide, ZP3-5 und ZP3-6, sowie Progesteron unter den gewählten experimentellen Bedingungen einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Induktion der Akrosomreaktion im bovinen System hatten.

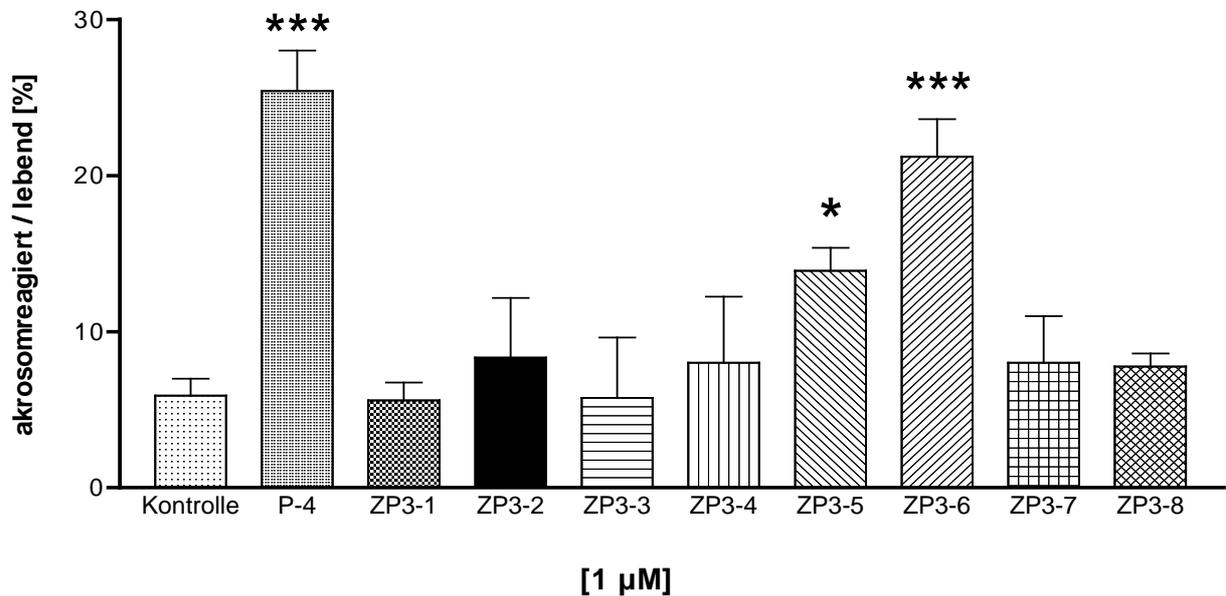


Abb. 19

*Induktion der Akrosomreaktion kryokonservierter boviner Spermatozoen mit synthetischen ZP3-Peptiden und P4. Auf der Abszisse sind die verwendeten synthetischen ZP3-Peptide, P4 und unbehandelten Kontrollspermatozoen aufgetragen. Die eingesetzten finalen Konzentrationen der ZP3-Peptide und des P4's waren jeweils 1µM. Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) angegeben. ☒ P<0,05; ☒☒☒ P<0,001; n=3.*

#### 4.2.2.2 Induktion der Akrosomreaktion durch synthetische ZP2- und Porin- Peptide

Als Negativkontrolle wurde eine Reihe weiterer synthetischer Peptide eingesetzt.

1. Synthetische Peptide aus der ZP2 Aminosäuresequenz (Tab. 4A).

Da das ZP2-Protein im bovinen System wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Induktion der Akrosomreaktion hat, war nicht davon auszugehen, dass diese ZP2-Peptide einen Einfluss auf die Akrosomreaktion haben.

Wie in Abb. 20 gezeigt konnte weder durch die Inkubation mit ZP2-1 (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) noch durch die Inkubation mit ZP2-4 (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) ein statistisch signifikanter Anstieg des Anteils lebender akrosomreagerter Spermatozoen ( $P>0,05$ ) erreicht werden. Das als Positivkontrolle eingesetzte P4 (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) induzierte statistisch signifikant die Akrosomreaktion ( $P<0,001$ ).

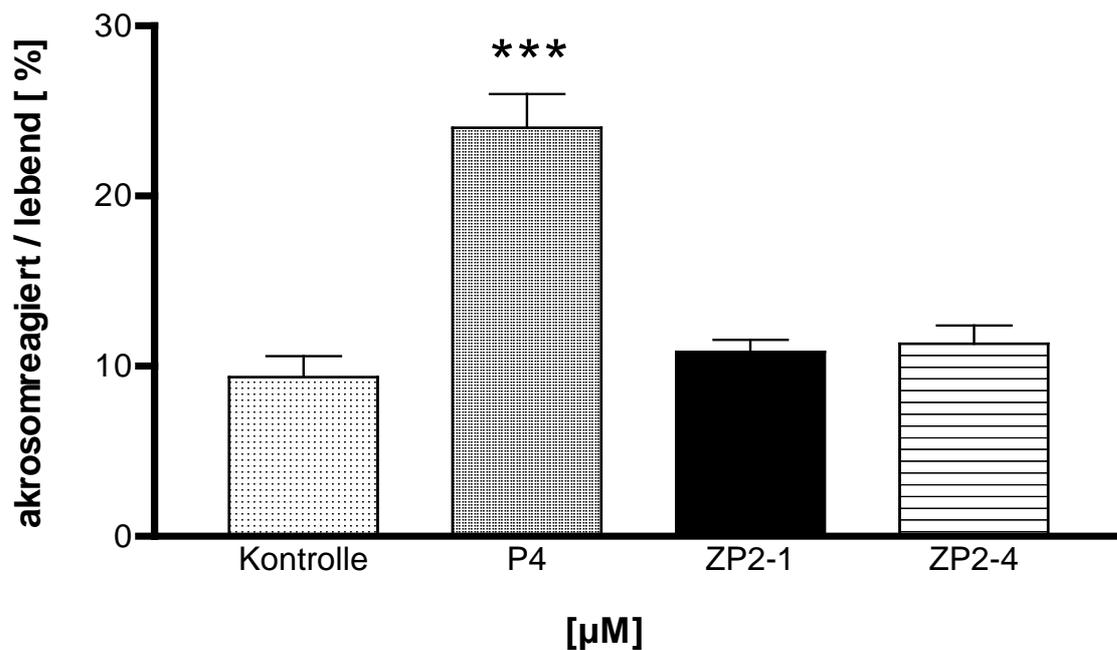


Abb.20

*Induktion der Akrosomreaktion boviner kryokonservierter Spermatozoen mit ZP2-Peptiden und P4. Auf der Abszisse sind die verwendeten synthetischen ZP2-Peptide, P4 und die unbehandelten Kontrollspermatozoen dargestellt. Die eingesetzten finalen Konzentrationen der ZP2-Peptide und des P4's betragen jeweils  $1\mu\text{M}$ . Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) angegeben. ☒☒☒  $P<0,001$ ;  $n=3$*

Tab. 4A

*Auflistung der Aminosäuresequenz im one letter code.*

<b>Peptid</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>Anzahl der Aminosäuren</b>	<b>Spezies</b>
<b>ZP2-1</b>	APNIKLVLDCCWATS	15	human
<b>ZP2-4</b>	SYPDNSYQQPYGE	13	human

2. Ebenso als Negativkontrolle wurden synthetische Peptide, die aus der Aminosäuresequenz boviner mitochondrialer Porine sequenziert worden waren, eingesetzt (Tab. 4, Peptid H1, H2, H3, H4). Auch von diesen Peptiden wurde aufgrund der intrazellulären Lokalisation der mitochondrialen Proteine keine signifikante Induktion der Akrosomreaktion erwartet.

Tab. 4B

*Auflistung der Aminosäuresequenz im one letter code.*

<b>Peptid</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>Anzahl der Aminosäuren</b>	<b>Spezies</b>
<b>H1</b>	YQLDPTASYSK	12	bovin
<b>H2</b>	NAGGHKVGLALELEA	15	bovin
<b>H3</b>	FGIAAKYQLDPT	12	bovin
<b>H4</b>	SVFNKGYGFM	10	bovin

Wie in Abb. 21 gezeigt konnte durch keines der verwendeten Porin-Peptide (H1,H2, H3, H4, f.c. jeweils 1 $\mu$ M) ein statistisch signifikanter Anstieg des Anteils lebender akrosomreagerter Spermatozoen gezeigt werden ( $P > 0,05$ ). Wie erwartet induzierte P4 (f.c.1 $\mu$ M) als Positivkontrolle statistisch signifikant ( $P < 0,001$ ) die Akrosomreaktion.

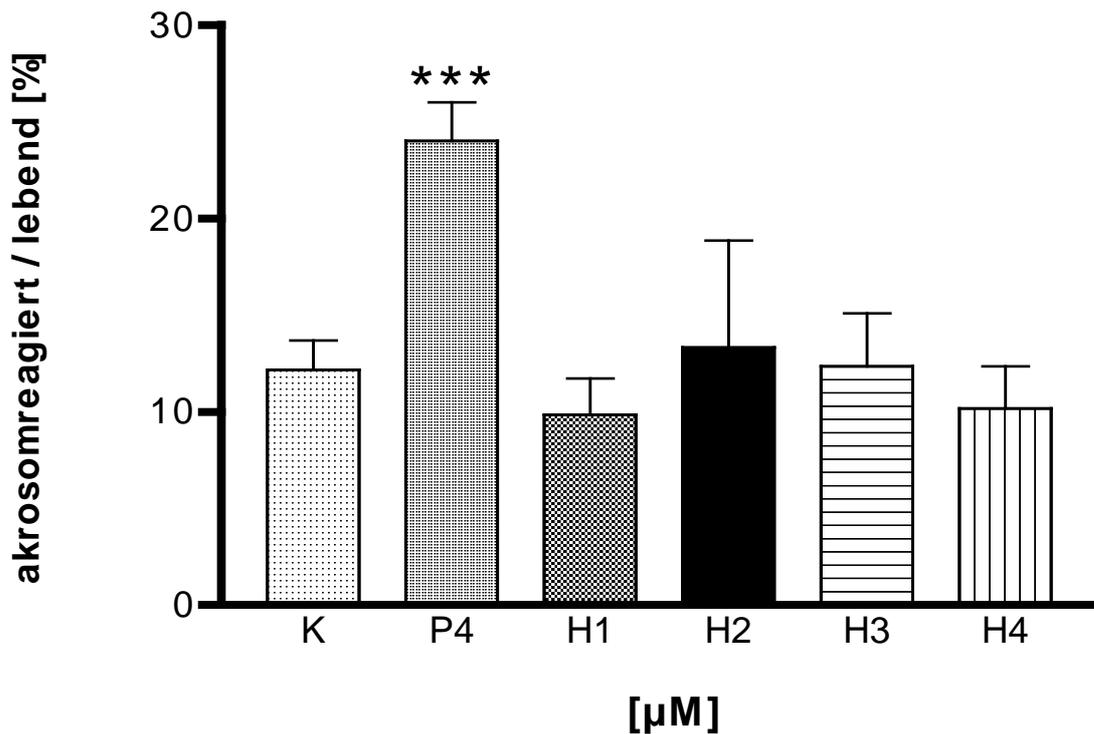


Abb. 21

Induktion der Akrosomreaktion boviner kryokonservierter Spermatozoen mit Porin Peptiden (H1, H2, H3, H4) und P4. Auf der Abszisse sind die verwendeten synthetischen Porin-Peptide, P4 und die Kontrolle dargestellt. Die eingesetzten finalen Konzentrationen der synthetischen Peptide und des Progesterons betragen jeweils  $1\mu\text{M}$ . Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) angegeben. ☒☒☒  $P < 0,001$ ;  $n=3$ .

### 4.2.3 Dosisabhängigkeit der durch ZP3-6 induzierten akrosomalen Reaktion

Da in den vorangegangenen Experimenten das ZP3-6 Peptid den deutlichsten Effekt auf die Induktion der Akrosomreaktion gezeigt hatte (siehe Abschnitt 3.2.2.1), konzentrierten sich die nachfolgenden Untersuchungen im Wesentlichen auf dieses Peptid.

Im Folgenden wurden Testungen zur Dosisabhängigkeit der Induktion der Akrosomreaktion mit dem ZP3-6 Peptid durchgeführt.

Zunächst wurden die Experimente mit kryokonservierten bovinen Spermatozoen durchgeführt, die ohne das Swim-up-Verfahren kapazitiert worden waren. In Abb. 22 sind die erzielten Ergebnisse graphisch dargestellt. Ab einer Zugabe von  $10\text{nM}$  ZP3-6 Peptid stieg der

prozentuale Anteil der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen von durchschnittlich 8% (Kontrolle) auf 18% (Test-Spermatozoen) statistisch signifikant an ( $P < 0,01$ ); ein maximaler Effekt konnte bei einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  erzielt werden (Anstieg auf 21% vitaler akrosomreagierter Spermatozoen ( $P < 0,01$ )). Höhere Peptid-Konzentrationen bis  $10 \mu\text{M}$  führten zu keinem weiteren Anstieg des Anteils akrosomal reagierter Spermatozoen (nicht gezeigt).

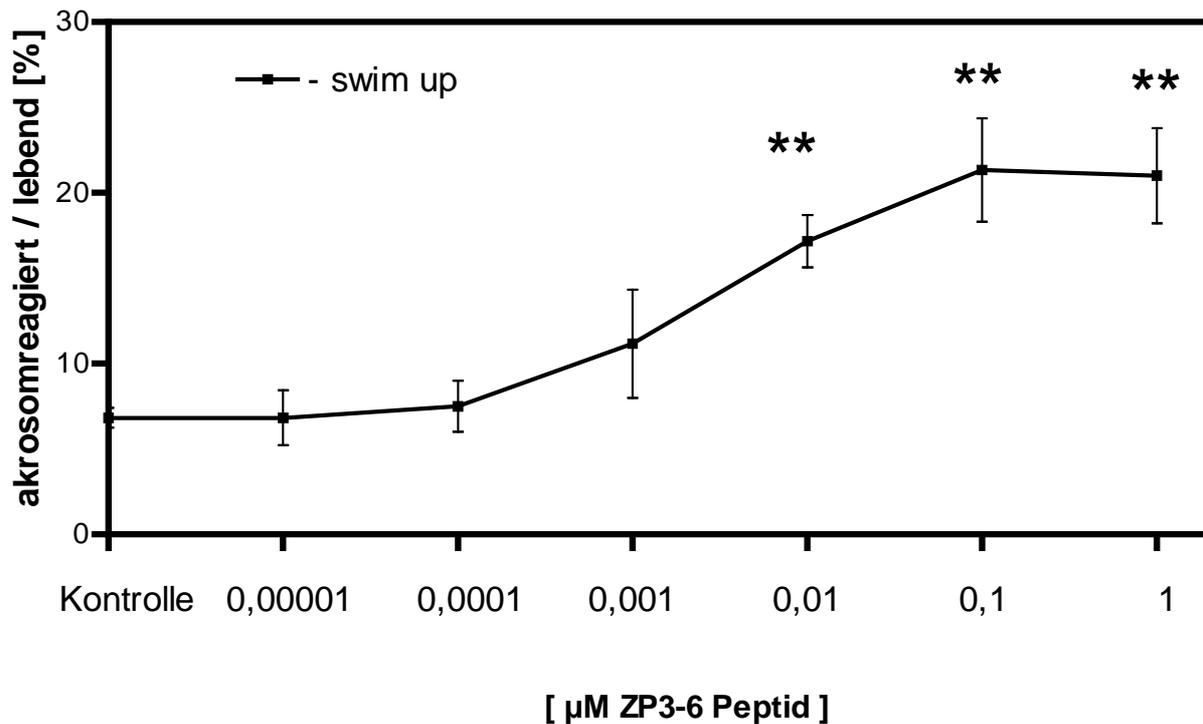


Abb. 22

*Dosisabhängige Induktion der Akrosomreaktion mit kapazitierten bovinen Spermatozoen durch das ZP3-6 Peptid. Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) angegeben, auf der Abszisse die Konzentrationen des ZP3-6 Peptides in  $\mu\text{M}$  aufgetragen. ☒  $P < 0,05$ ; ☒☒  $P < 0,01$ ;  $n=3$ .*

Vergleichend wurden anschließend Untersuchungen zur Induktion der Akrosomreaktion mit ZP3-6 Peptid an kryokonservierten bovinen Spermatozoen, die nach dem Swim-up-Verfahren kapazitiert worden waren, durchgeführt.

Die erzielten Ergebnisse sind in Abb. 23 graphisch dargestellt. Schon nach einer Zugabe von  $1 \text{nM}$  ZP3-6 Peptid stieg der prozentuale Anteil der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen im Vergleich zur Kontrolle von durchschnittlich 5% auf 11% (Test-Spermatozoen) statistisch

signifikant an ( $P < 0,05$ ). Der maximale Anstieg von 5% (Kontrolle) auf 20% (Test-Spermatozoen) wurde durch die Inkubation mit  $1\mu\text{M}$  ZP3-6 erzielt ( $P < 0,01$ ).

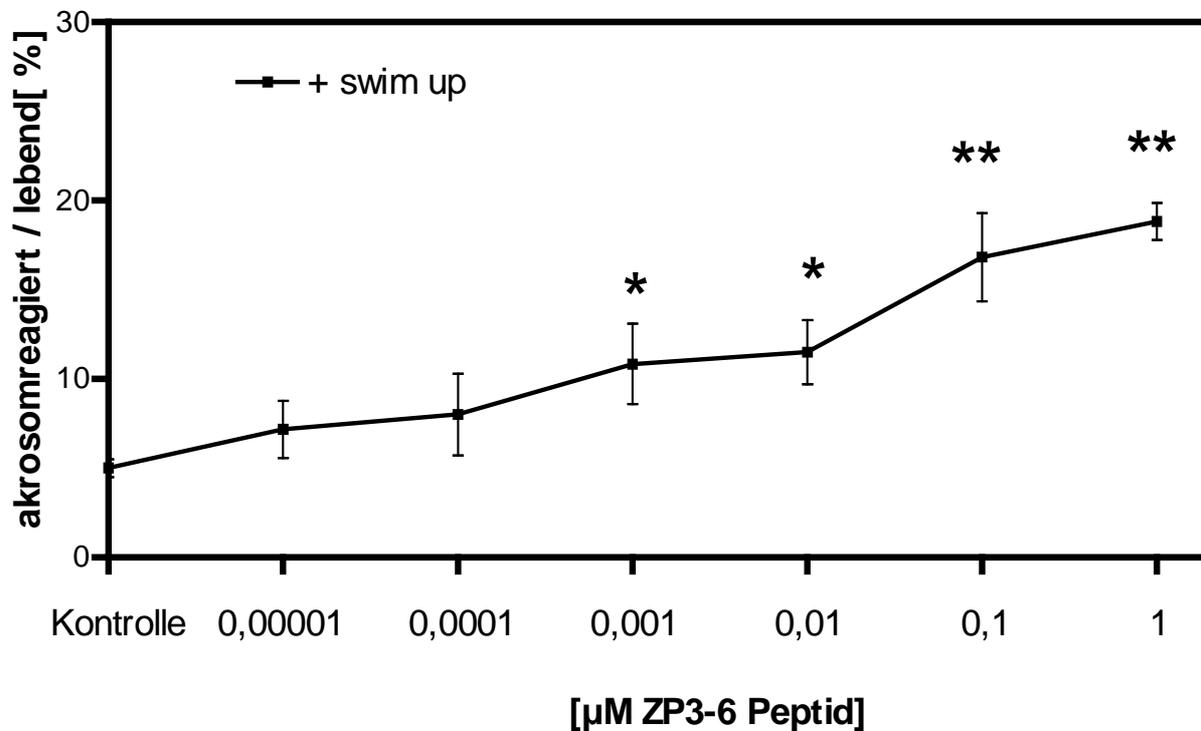


Abb. 23

*Dosisabhängige Induktion der Akrosomreaktion an durch das Swim-up-Verfahren aufbereiteten kryokonservierten Spermatozoen mit dem ZP3-6 Peptid. Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) angegeben, auf der Abszisse die Konzentrationen des ZP3-6 Peptides in  $\mu\text{M}$  aufgetragen. ☒  $P < 0,05$ ; ☒☒  $P < 0,01$ ;  $n=3$ .*

Der Vergleich beider Versuchsreihen (Abb. 22 und 23) zeigte eine prinzipielle Übereinstimmung der Ergebnisse. Wie in Tabelle 5 gezeigt bestand bei der Verwendung der meisten Konzentrationen (0,00001, 0,0001, 0,001, 0,1,  $1\mu\text{M}$ ) kein statistisch signifikanter Unterschied in der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion von mit und ohne swim-up kapazitierten Spermatozoen.

Allerdings konnte an den nach dem Swim-up-Verfahren aufbereiteten und kapazitierten Spermatozoen schon mit  $1\text{nM}$  ZP3-6 Peptid im Gegensatz zu  $10\text{nM}$  an den ohne swim-up aufbereiteten Spermatozoen ein signifikanter Anstieg des Anteils vitaler akrosomreagierter Spermatozoen beobachtet werden.

In den Kontrollen lag der Anteil spontan akrosomreagerter Spermatozoen in den ohne swim-up aufbereiteten Spermatozoen (8%) im Mittel etwas höher als in den mit swim-up kapazitierten Spermatozoen (5%).

Tab. 5

*Tabelle 5 enthält die statistische Auswertung des Vergleichs der in Abb. 22 und Abb. 23 dargestellten Experimente. Die dosisabhängige Induktion der Akrosomreaktion an bovinen kryokonservierten Spermatozoen wurde an nach dem Swim-up-Verfahren und ohne Swim-up-Verfahren aufbereiteten und kapazitierten Spermatozoen getestet. ns: nicht signifikant.*

<b>Vergleich zweier Kapazitationsverfahren</b>			<b>P-Wert</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>mit swim-up</b>	<b>versus</b>	<b>ohne swim-up</b>		
<b>µM</b>		<b>µM</b>		
Kontrolle	versus	Kontrolle	p = 0,0137	signifikant
0,00001	versus	0,00001	p = 0,8060	ns
0,0001	versus	0,0001	p = 0,7874	ns
0,001	versus	0,001	p = 0,9179	ns
0,01	versus	0,01	p = 0,0052	signifikant
0,1	versus	0,1	p = 0,1160	ns
1	versus	1 -	p = 0,3077	ns

Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen von homologem ZP3-6 Peptid, P4 (Positivkontrolle) und von Maus-ZP3-1 Peptid (Negativkontrolle) betreffend der Induktion der Akrosomreaktion wurden in einem parallelen Versuchsansatz miteinander verglichen und in Abb. 24 graphisch dargestellt.

Mit dem ZP3-6 Peptid und mit P4 wurde ab einer Konzentration von 10nM ein deutlicher Anstieg des Prozentsatzes lebend akrosomreagerter Spermatozoen ermittelt. Beide Kurven zeigten den typisch sigmoidalen Verlauf einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Ab einer Konzentration von 100nM bildete sich ein Plateau aus; hier erreichten beide Kurven eine Sättigung. Der Absolutwert der maximalen Induktion lag bei ZP3-6 Peptid etwas niedriger als nach Einsatz von Progesteron. Eine statistisch signifikante Induktion der Akrosomreaktion durch das ZP3-1 Peptid konnte erwartungsgemäß nicht festgestellt werden.

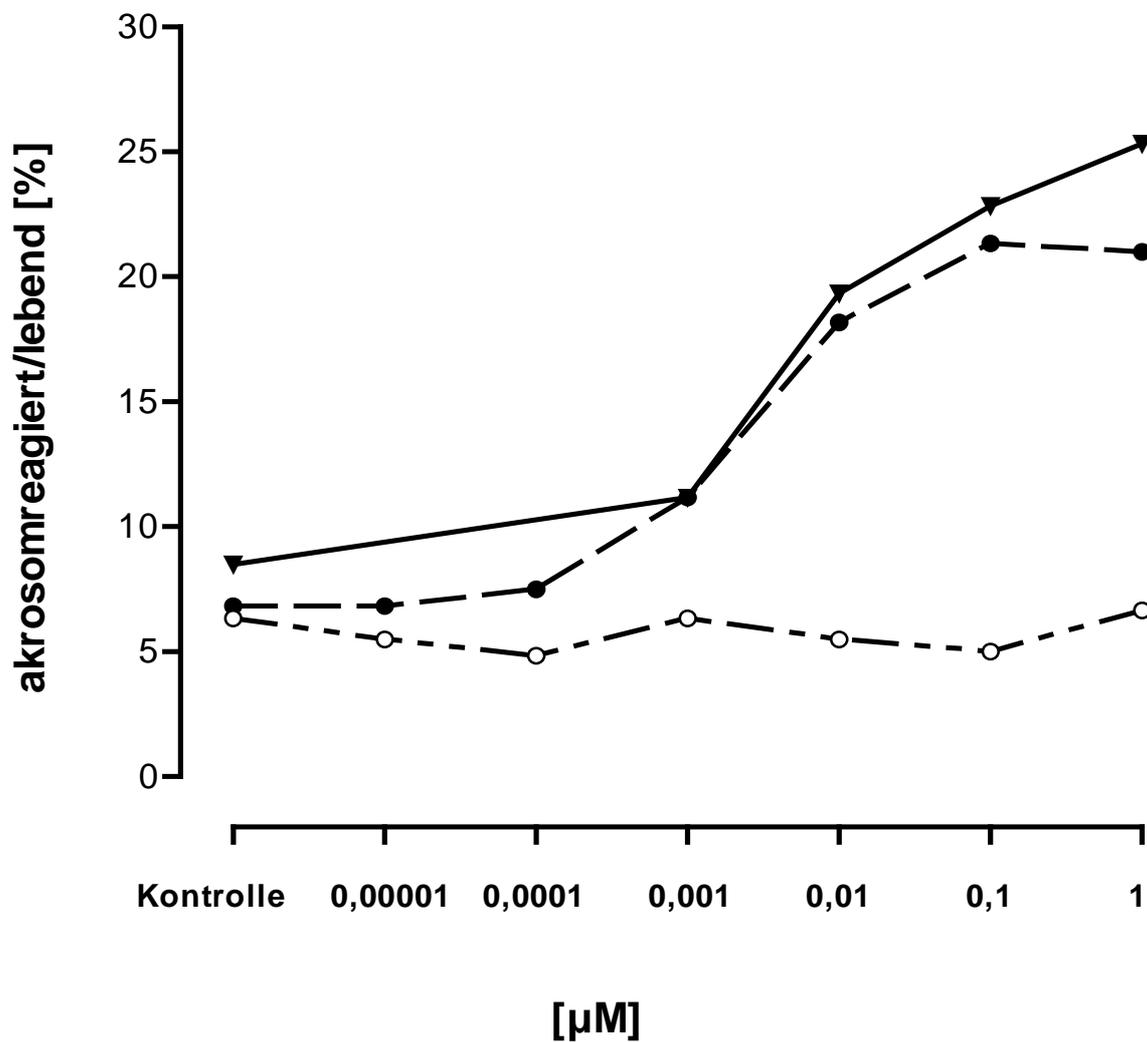


Abb. 24

Dosisabhängigkeit der Induktion der Akrosomreaktion durch das ZP3-6 Peptid ( - $\blacktriangle$ - ) und durch Progesteron ( - $\bullet$ - ). Als Negativkontrolle wurde das ZP3-1 Peptid ( - $\circ$ - ) eingesetzt. Auf der Ordinate ist der prozentuale Anteil lebend akrosomreagierter Spermatozoen angegeben (Mittelwert), auf der Abszisse die Konzentrationen der eingesetzten Testsubstanzen in  $\mu\text{M}$  aufgetragen. (n=3).

#### **4.2.4 Induktion der Akrosomreaktion mit Progesteron und ZP3-6 Peptid**

Um zu testen, ob durch eine Inkubation mit P4 und ZP3-6 Peptid gemeinsam der Anteil akrosomreagerter Spermatozoen additiv oder überadditiv erhöht wird, wurden kryokonservierte mit dem Swim-up-Verfahren kapazitierte bovine Spermatozoen mit beiden Induktoren, Progesteron (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) und dem ZP3-6 Peptid (f.c.  $1\mu\text{M}$ ), gemeinsam koinkubiert. Zum Vergleich wurden Spermatozoen ausgewertet, die jeweils mit nur einem Induktor (ZP3-6 f.c.  $1\mu\text{M}$ , oder P4 f.c.  $1\mu\text{M}$ ) versetzt worden waren (Abb. 25). Die Ergebnisse zeigten, dass der prozentuale Anstieg akrosomreagerter Spermatozoen nach Zugabe der Induktoren in allen drei Versuchsansätzen etwa gleich war. Der Anteil akrosomreagerter Spermatozoen konnte im Mittel im Vergleich zur Kontrolle (11%) nach Induktion mit P4 auf 21% ( $P < 0,01$ ), mit ZP3-6 Peptid (ZP3-6) auf 22% ( $P < 0,01$ ) und mit der Kombination von P4 und ZP3-6 Peptid (P4 + ZP3-6) auf 23% gesteigert werden ( $P < 0,01$ ). Beim Vergleich der Ergebnisse der Induktoren bzw. der Kombination der Induktoren miteinander konnte kein signifikanter Unterschied bezogen auf die Induktion der Akrosomreaktion lebender Spermatozoen errechnet werden ( $P > 0,05$ ).

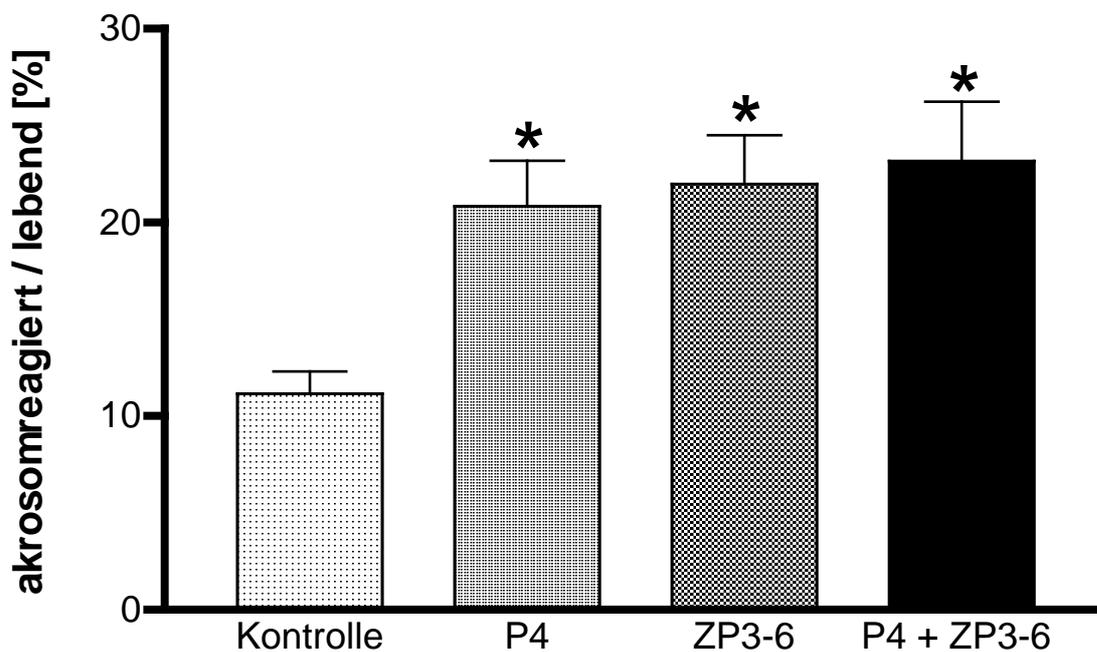


Abb. 25

*Induktion der Akrosomreaktion kryokonservierter boviner Spermatozoen mit 1 $\mu$ M ZP3-6 Peptid, 1 $\mu$ M P4 und die gleichzeitige Kombination beider Induktoren; als Kontrolle wurden unbehandelte Spermatozoen (Kontrolle) eingesetzt. Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) angegeben. ☒  $P < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n=3$ .*

Die zeitversetzte (konsekutive) Induktion der Akrosomreaktion mit P4 (f.c. 1 $\mu$ M, 5min) und anschließender Inkubation mit dem ZP3-6 Peptid (f.c. 1 $\mu$ M, 20min) ist im Vergleich zu der alleinigen Inkubation mit entweder P4 oder ZP3-6 Peptid in Abb. 26 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigten, dass der prozentuale Anstieg akrosomreagierter Spermatozoen durch die zeitversetzte Gabe keinen additiven Effekt aufwies. Der Anteil akrosomreagierter Spermatozoen konnte im Mittel im Vergleich zur Kontrolle (7%) nach Induktion mit Progesteron auf 20% ( $P < 0,05$ ), mit ZP3-6 Peptid auf 20,5% ( $P < 0,01$ ) und mit der konsekutiven Gabe von P4 und ZP3-6 Peptid (P4+ZP3-6) auf 21% gesteigert werden ( $P < 0,01$ ).

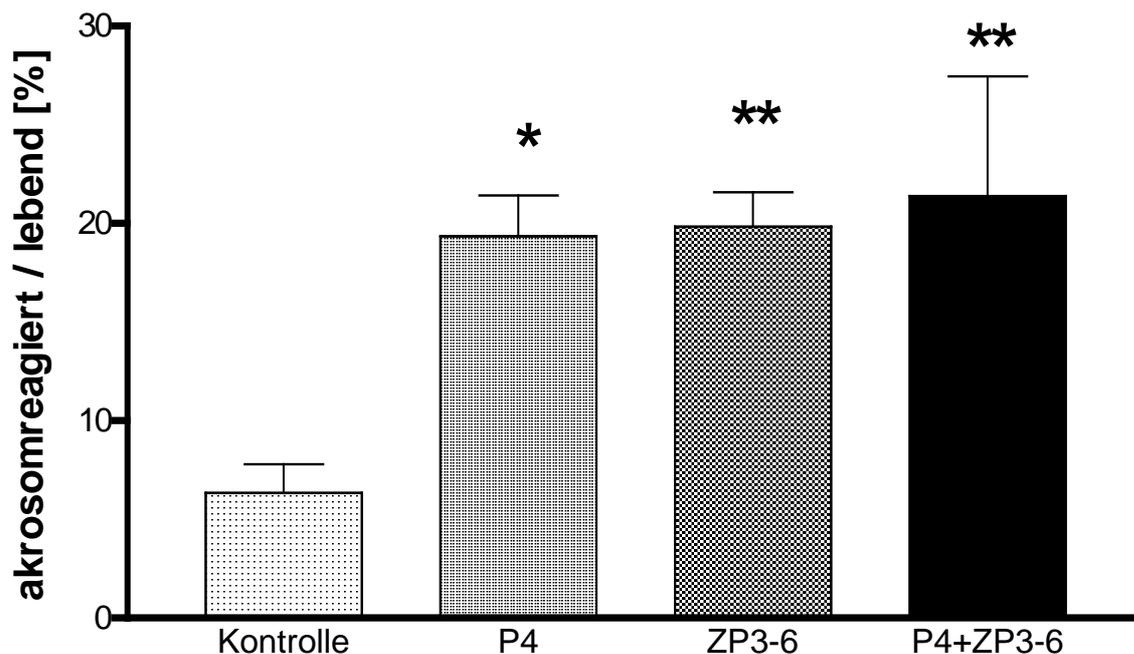


Abb. 26

Auf der Abszisse dargestellt die Induktion der Akrosomreaktion durch ZP3-6 Peptid (ZP3-6, f.c.  $1\mu\text{M}$ ), P4 (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) und die konsekutive Inkubation zuerst mit P4 und nachfolgend mit ZP3-6 Peptid (P4+ZP3-6, jeweils  $1\mu\text{M}$ ). Als Kontrolle wurden unbehandelte Spermatozoen (Kontrolle) eingesetzt. Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) angegeben. ☒  $P < 0,05$ ; ☒ ☒  $P < 0,01$ ;  $n=3$ .

Es konnte weder durch eine gleichzeitige noch durch eine zeitversetzte Gabe von Progesteron und/oder ZP3-6 Peptid (f.c. ZP3-6 Peptid  $1\mu\text{M}$ , Progesteron  $1\mu\text{M}$ ) ein additiver Effekt bezüglich der Induktion der Akrosomreaktion beobachtet werden.

#### 4.2.5 Einfluss von Pertussistoxin (PTX) auf die mit ZP3-6 Peptid und Progesteron induzierte akrosomale Exozytose

Aus Untersuchungen im Maussystem und auch beim Bullen war bekannt, dass PTX die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch gereinigtes ZP3 Protein und ebenso durch solubilisierte Zona pellucida Proteine hemmen kann. Dagegen konnte die Induktion der Akrosomreaktion mit Progesteron durch eine PTX-Präinkubation nicht gehemmt werden.

Aufgrund dieser Studien sollte überprüft werden, ob die Induktion der Akrosomreaktion durch das ZP3-6 Peptid durch PTX gehemmt werden konnte, und ob es sich bestätigen lässt, dass

---

die Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron über eine PTX-unabhängige Signaltransduktionskaskade läuft.

Dazu wurden kryokonservierte bovine Spermatozoen nach der Kapazitation durch das Swim-up-Verfahren mit PTX präinkubiert. Als Kontrollen dienten erstens mit ZP3-1 Peptid behandelte Spermatozoen und zweitens Zellen, die nicht mit PTX präinkubiert worden waren (Abb. 27).

Der Anteil akrosomreagerter vitaler Spermatozoen unter PTX-freien Bedingungen stieg nach Inkubation mit ZP3-6 Peptid von durchschnittlich 7% auf 18% an. Dieses wurde als statistisch signifikant bewertet ( $P < 0.01$ ). Für die mit ZP3-1 Peptid inkubierten Spermatozoen lag der prozentuale Anteil bei 6%, welches sich als statistisch nicht signifikant von der Negativkontrolle (unbehandelte Spermatozoen) unterschied ( $P > 0,05$ ). Mit PTX präinkubierte Samenzellen wiesen nach Zugabe von  $1\mu\text{M}$  ZP3-6 Peptid durchschnittlich 8% akrosomreagierte lebende Spermatozoen auf. Im Vergleich zu den Kontrollen war keine Erhöhung des prozentualen Anteils akrosomreagerter lebender Zellen nachzuweisen ( $P > 0,05$ ).

Wurden identische Experimente mit P4 als Induktor durchgeführt, hatte PTX keinen hemmenden Effekt auf den Signaltransduktionsweg, der zur durch P4 induzierten Akrosomreaktion führt: mit PTX präinkubierte kapazitierte Spermatozoen wiesen, im Gegensatz zu den mit ZP3-6 Peptid behandelten Zellen, nach Zugabe von  $1\mu\text{M}$  Progesteron einen statistisch signifikanten Anstieg ( $P < 0,01$ ) des Anteils vitaler akrosomreagerter Samenzellen auf 22% auf. Im Parallelversuch stieg der Anteil lebender akrosomreagerter Zellen durch die Inkubation mit P4 und ohne PTX (f.c.  $1\mu\text{M}$ ) auf im Mittel 21% an ( $P < 0,01$ ). Damit bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Induktion der Akrosomreaktion mit und ohne PTX-Präinkubation ( $P > 0,05$ ).

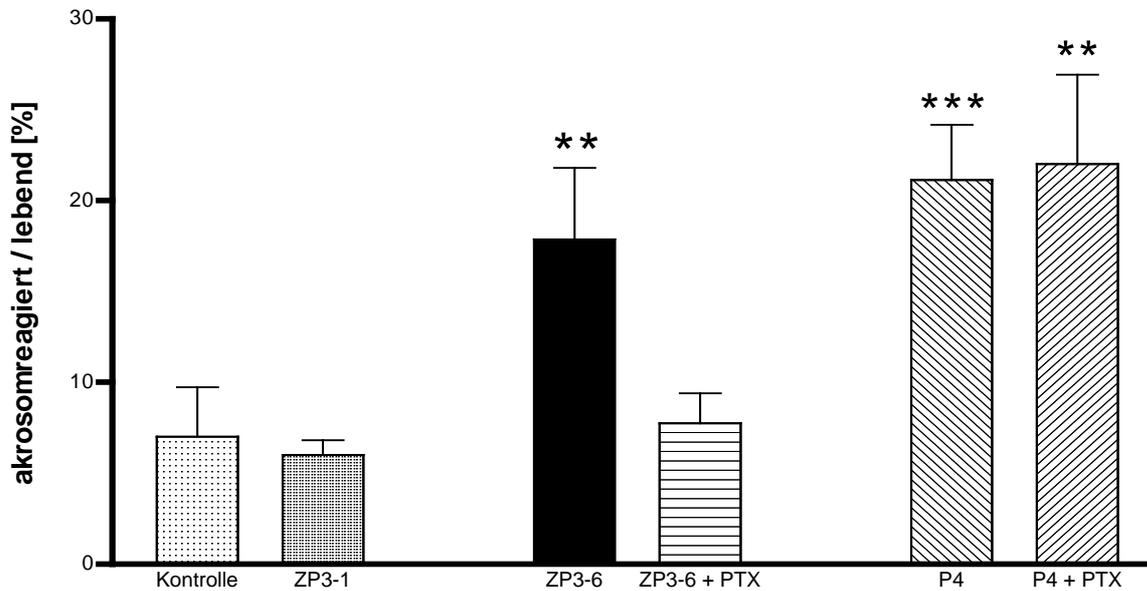


Abb. 27

*Einfluss von PTX auf die ZP3-6 Peptid- und P4n-induzierte Akrosomreaktion kryokonservierter boviner Spermatozoen. Die Spermatozoen wurden nach 3h Kapazitation mit 10ng/ml Pertussistoxin über 1h präinkubiert (+ PTX). Die Induktion der Akrosomreaktion erfolgte mit ZP3-6 Peptid (ZP3-6, 1 $\mu$ M) oder P4 (1 $\mu$ M). Als Kontrollen wurden mit PTX präinkubierte Spermatozoen ohne Induktor(Kontrolle) und mit ZP3-1 Peptid (ZP3-1) behandelte Zellen eingesetzt. Auf der Ordinate ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der lebenden akrosomreagierten Spermatozoen mit den entsprechenden Standardabweichungen angegeben. ☒☒  $P < 0,01$ ; ☒☒☒  $P < 0,001$ ;  $n = 4$ .*

## 5 Diskussion

Ziel der Untersuchungen war es, die Akrosomreaktion von bovinen Test-Spermatozoen mit möglichst physiologischen Induktoren zu induzieren und ein reproduzierbares Testsystem im bovinen Modell zu etablieren. Als Ausgangsmaterial wurden kryokonservierte bovine Spermatozoen gewählt.

Dieses Testsystem hatte sich gegenüber anderen Testsystemen in mehreren Punkten als vorteilhaft erwiesen:

1. gute Verfügbarkeit der Testzellen
2. keine Tierversuche sind notwendig
3. mit ein und demselben Ejakulat konnten mehrere Testreihen durchgeführt werden
4. das bovine Ejakulat enthält fast ausschließlich morphologisch homogene Spermatozoen
5. gute Anfärbbarkeit und Beurteilbarkeit nach Färbung mit H33258 und PSA-FITC
6. ausreichende Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch physiologische Induktoren (Progesteron, solubilisierte Zona pellucida)

Dass kryokonservierte Spermatozoen unter den gewählten Bedingungen Eizellen befruchten können, ist in Feldversuchen über die künstliche Besamung gezeigt worden (Hinsch et al., 1997; Müller-Schlösser et al., 1995).

Ein wichtiger Vorteil der Kryokonservierung besteht in einem positiven Einfluss auf die Kapazitation (Cormier et al., 1997). So wurde beobachtet, dass der Prozentsatz lebender, akrosomal reagierter Spermatozoen nach Kapazitation und Induktion durch physiologische Induktoren (Progesteron) höher lag als bei Spermatozoen aus frischen bovinen Ejakulaten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass neben den bekannten Schäden nach dem Einfrieren und Auftauen der Samenzellen (Veränderungen der Morphologie und Funktion der Spermatozoen über Kristallbildung) kryokonservierte Spermatozoen eine höhere Empfindlichkeit für das Auslösen der akrosomalen Reaktion aufweisen. Verantwortlich dafür können Einfrier- und Auftauprozesse sein und/oder Veränderungen des Aufbaues der Plasmamembran durch Komponenten des Verdünners, die den Kapazitationsprozess beschleunigen. In einer Arbeit von Zhao und Buhr (1995) wurde berichtet, dass die Entfernung von Substanzen, die die Plasmamembran stabilisieren oder Verletzungen der Membranintegrität während des Einfrier-/Auftauprozesses zu Veränderungen des Kalziumfluxes führten. Dieser Effekt kann zu einer höheren Rate spontaner Akrosomreaktionen führen. Veränderungen der freien intrazellulären Kalziumkonzentration

---

während der Kühl- und Aufwärmphase hätten zur Folge, dass die Aktivität der Kalzium- und Magnesium-ATPase (Kalziumpumpe) bei niedrigen Temperaturen modifiziert wird (Holt & North, 1986). Diese Veränderungen in Verbindung mit Substanzen (z.B. Lipide) in Verdünnern, die den Kapazitationsprozess verstärken, könnten für die erfolgreiche Kapazitation und bessere Induzierbarkeit der Akrosomreaktion von kryokonservierten Spermatozoen verantwortlich sein.

Die in dieser Arbeit verwendeten Spermatozoen waren mit dem Kryoprotektivum Biociphos® kryokonserviert worden. In Untersuchungen war gezeigt worden, dass so behandelte bovine Spermatozoen eine ähnliche Konzeptionsrate wie in Triladyl® kryokonservierte Spermatozoen aufwiesen (Müller-Schlösser, 1995).

In einem nächsten Schritt ging es darum, eine Methoden zu evaluieren, mit der der akrosomale Status zuverlässig beurteilt werden kann. Hier war vor allem eine eindeutige Unterscheidbarkeit der degenerativen Akrosomreaktion von der induzierten Akrosomreaktion wichtig. In der Literatur werden hierzu mehrere Färbesysteme beschrieben [(H33258, PSA-FITC, Naphtol yellow, Erythrosin B, Trypan blau, Chlortetracycline) (Florman & First, 1988; Miller et al., 1990; Kay et al., 1994, Parinaud et al., 1992, Hewitt & England, 1998)].

Als beste Methode stellte sich die Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe PSA-FITC und H33258 heraus. Diese lieferten in vergleichenden Untersuchungen eine gute Beurteilbarkeit der Akrosomreaktion sowie der Vitalität an kryokonservierten bovinen Spermatozoen. Der Vorteil der Fluoreszenzfärbetechnik liegt in der guten Unterscheidbarkeit zwischen akrosomintakten und akrosomreagierten Spermatozoen sowie zwischen toten und lebenden Zellen. Nachteilig aber ist, dass die Fluoreszenzfärbungen mit der Zeit verblassen und direkt nach Beendigung der Färbung ausgewertet werden müssen.

Ein weiterer Nachteil der verwendeten Methode liegt in der Subjektivität der Auswertung. Um dem zu begegnen, wurden zu Beginn der Untersuchungen zuverlässige Rahmenbedingungen festgelegt. Da die Auszählung von 400 Spermatozoen keine prinzipiell anderen Ergebnisse brachte als das Auszählen von 200 Spermatozoen, wurden jeweils 200 Spermatozoen pro Objektträger ausgewertet. Zur Kontrolle der Auswertungskriterien wurden die Experimente von 2 Untersuchern doppelt blind ausgewertet. Hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse.

Trotz dieser Maßnahme zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schwankte der Anteil lebender akrosomreagierter Spermatozoen nach Induktion mit dem selben Induktor erheblich. Dies kann damit erklärt werden, dass der Anteil boviner akrosominduzierbarer

---

Spermatozoen bei max. 20 bis 30% der Spermatozoen liegt (Tesarik et al., 1992). Bei frischen bovinen Spermatozoen war die Induzierbarkeit im Vergleich dazu deutlich geringer. Wie eigene Untersuchungen gezeigt haben, waren bovine Spermatozoen aus frischen Ejakulaten auch nach einer 6-stündigen Kapazitation deutlich motiler als die kryokonservierten Spermatozoen.

Aufgrund der Subjektivität in der Auswertung bei den unterschiedlichen Färbetechniken sind in der Literatur auch andere Meßtechniken beschrieben worden. So wurde die Akrosinaktivität nach der Induktion der Akrosomreaktion in den Spermatozoensuspensionen gemessen (Margalit et al., 1997; Sillerico et al., 1996), als auch eine maschinelle Auswertung der mit FITC-markierten Spermatozoen mit dem Flowcytometer durchgeführt (Nolan et al., 1992; Graham et al., 1990). Die Flowcytometrie bietet interessante Vorteile, wie z.B. eine objektivere Auswertung sowie die Beurteilung einer großen Anzahl Spermatozoen in kurzer Zeit.

Eine interessante Modifikation der Flowcytometrie wurde in einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung beschrieben. Hier wurde die Akrosomreaktion mit einem monoklonalen Antikörper CD46 detektiert. CD 46 ist ein Regulatorprotein und konnte auf der inneren akrosomalen Membran nachgewiesen werden (Bronson et al., 1999).

Betrachtet man den gegenwärtigen Stand der Literatur, so gibt es derzeit noch keine ideale Meßmethode zur Unterscheidung der Akrosomreaktion an lebenden oder toten Spermatozoen. Die erhaltenen Ergebnisse müssen daher grundsätzlich vor dem Hintergrund der Subjektivität der verwendeten Messtechnik und der verwendeten Probenaufbereitung interpretiert werden.

Hinsichtlich des Kapazitationsmediums werden in der Literatur unterschiedliche Medien beschrieben. Die meisten Arbeitsgruppen haben ein modifiziertes TALP-Medium verwendet (Farrell et al., 1996). Im Wesentlichen unterscheiden sich die verwendeten Medien durch differente Elektrolytkonzentrationen. Das in dieser Arbeit verwendete Medium enthält neben den im TALP-Medium enthaltenen Salzen zusätzlich Spurenelemente wie  $\text{CuSO}_4$ , Fe, Zn und einige Vitamine. Durch den im Medium enthaltenen Hepes-Puffer konnte der pH-Wert stabil gehalten werden, auch ohne dass die Spermatozoen in einem  $\text{CO}_2$  Inkubator aufbewahrt werden mussten. Damit entspricht das verwendete F10 Ham Hepes Medium im Wesentlichen den allgemein verwendeten Kapazitationsmedien.

Die Schwierigkeit bei der Kapazitation besteht darin, dass derzeit noch nicht im Detail bekannt ist, welche Veränderungen des Spermatozoons in der Kapazitation ablaufen. So wird

---

von einigen Arbeitsgruppen im bovinen System dem Kapazitationsmedium Heparin zugesetzt (Cordoba et al., 1997; Lane et al., 1999). Nachteilig an der Verwendung von Heparin ist, dass es insbesondere bei aufgetauten kryokonservierten Zellen Agglutinationen der Spermatozoen begünstigt. Die unter Zusatz von Heparin kapazitierten Spermatozoen waren daher nach der Anfärbung zur Bestimmung des akrosomalen Status deutlich schlechter oder gar nicht zu beurteilen. Aus diesem Grund wurde auf die Verwendung von Heparin verzichtet.

Dass BSA (bovines Serum-Albumin) die Kapazitation begünstigt, wird derzeit allgemein akzeptiert. Es wird von fast allen Arbeitsgruppen dem Medium zur Kapazitation hinzugegeben. Die Unterschiede in der Literatur bestehen in den verwendeten Konzentrationen, diese reichen von 1mg/ml (Nolan et.al., 1992) bis zu 6mg/ml (Florman & First, 1988). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde 3mg/ml BSA verwendet. Für die Wirkungsweise von BSA gibt es derzeit nur wenige Hinweise in der Literatur. Ein wesentlicher Mechanismus scheint die Begünstigung der Cholesteroleffluxes aus der Spermatozoenplasmamembran zu sein. Dadurch wird das Cholesterol/Phospholipid Verhältnis der Membranen zugunsten einer erhöhten Membranfluidität, die eine akrosomale Reaktion begünstigt, verändert.

Leider ist es bislang nicht möglich, die Kapazitation eindeutig zu messen. In der Literatur werden einige Anhaltspunkte beschrieben. So wird vermutet, dass es im Verlauf der Kapazitation zu einer zunehmenden Proteintyrosinphosphorylierung kommt. Man geht dabei davon aus, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel zu einer Aktivierung der Proteinkinase-A führt, die wiederum eine Protein-Tyrosin-Kinase aktiviert (Burks et al., 1995, Visconti et al., 1995, Osheroff et al., 1999; Visconti et al., 1999). Zur Detektion der Tyrosinphosphorylierung wurde ein Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (4G10) verwendet. Vergleichend wurden in der vorliegenden Arbeit vier gängige Kapazitationsansätze untersucht. Allein bei den in F10 Ham Hepes + 0,3%BSA und den in F10 Ham + 0,3%BSA kapazitierten Spermatozoen konnte eine Veränderung der Proteintyrosinphosphorylierung über die Kapazitationsdauer gezeigt werden. Proteine mit einer apparenten Molekularmasse von 7,1 kDa zeigten nach ca. 30min Kapazitation eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung. Mit einem anderen Phosphotyrosinantikörper (PY 20) konnte dieser Effekt aber nicht reproduziert werden. Trotzdem wären sicherlich weitere Untersuchung zur näheren Charakterisierung der detektierten 7,1 kDa Proteine sinnvoll. Prinzipiell ist davon auszugehen, dass alle vier getesteten Medien geeignet sind, die Kapazitation zu fördern. Die Bestimmung der

---

Tyrosinphosphorylierung mit den beiden getesteten Antikörpern scheint allerdings nur bedingt geeignet wesentliche Merkmale der Kapazitation zu erkennen.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, durch Untersuchungen der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion Anhaltspunkte über die Kapazitation zu erhalten. Da aber allen Untersuchungsergebnissen zur Folge die Induktion der Akrosomreaktion nur bei einem geringen Prozentsatz der Spermatozoen (20-30%) möglich ist, ist es schwierig hierüber Kapazitationsmedien oder den Kapazitationsprozess zu optimieren. Die Möglichkeit, einen direkten Marker der Kapazitation zu bestimmen, wäre für diese Fragestellung sicherlich wünschenswert, ist aber in der Literatur bislang nicht beschrieben worden.

In den im Folgenden hier vorgestellten Untersuchungen an kryokonservierten bovinen Spermatozoen sollte untersucht werden, wie durch möglichst physiologische Induktoren die Akrosomreaktion induziert werden kann.

Als physiologisch gelten in diesem Zusammenhang diejenigen Induktoren der Akrosomreaktion, mit denen das Spermatozoon im Laufe des natürlichen Befruchtungsprozesses in Kontakt kommt.

1) Dazu gehören die Zona pellucida Proteine. Eingesetzt werden können aus Ovarien präparierte Zonae (Bastiaan et al., 1999), gentechnisch hergestellte rekombinante Zonaproteine (Brewis et al., 1998), und die hier verwendeten synthetisch hergestellten Peptide aus dem ZP3 Protein.

2) Neben den Zona pellucida Proteinen zählt Follikularflüssigkeit (FF), die Progesteron (P4) als Induktor enthält, zu den physiologischen Induktoren (Tesarik et al., 1993). Progesteron als Induktor wurde in verschiedenen Spezies erfolgreich eingesetzt, hauptsächlich im murinen System (Murase & Roldan, 1996; Kholkute et al., 1995). Auch beim Menschen (Kay et al., 1994) ist Progesteron als Induktor der Akrosomreaktion erfolgreich angewendet worden. Es ist nicht bekannt, mit welchen Progesteronkonzentrationen das Spermatozoon *in vivo* in Kontakt kommt. Sehr wahrscheinlich ist diese Konzentration sehr gering. Damit ist auch unklar, ob die *in vitro* verwendeten Progesteron Konzentrationen als physiologisch zu bezeichnen sind. Die Progesteronkonzentrationen im Bereich der Kumulusmatrix und im Eileiter sind *in vivo* nur schwer zugänglich und können damit auch schlecht gemessen werden. Gut vorstellbar ist, dass die Progesteronkonzentration im Bereich der Kumulusmatrix deutlich höher sind als im Verlauf des Eileiters. Dies wäre auch vom Ablauf der Befruchtung sinnvoll, da die Akrosomreaktion erst dann ablaufen soll, wenn sie ihren physiologischen Nutzen entfalten kann, wie z.B. bei der Passage der Kumulusmatrix. Interessant in diesem

Zusammenhang sind die Untersuchungen von Fehl (Fehl et al., 1995), in denen an menschlichen Spermatozoen gezeigt wurde, dass der Anteil lebender akrosomreagerter Spermatozoen nur dann anstieg, wenn die Spermatozoen mit Progesteron (112ng/ml) und mit einem Kortikoid-Bindungs-Globulin inkubiert worden waren. Als Komplex mit einem Progesteron-Rezeptor könnte über diesen Mechanismus eine Erhöhung der lokalen Progesteron-Konzentration ursächlich gewesen sein.

Bei dem Progesteron-Rezeptor des Spermatozoons handelt es sich möglicherweise um einen nicht genomischen Oberflächenrezeptor. Untersuchungen von mit BSA gekoppeltem Progesteron haben gezeigt, dass nur ca. 10-30% der humanen kapazitierten Spermatozoen einen Progesteron-Rezeptor-Komplex aufweisen (Blackmore et al., 1991; Tesarik et al., 1992). Diese Untersuchungen zeigen eine gute Übereinstimmung mit dem auch im bovinen System maximal erreichbaren Anteil lebender akrosomreagerter Spermatozoen (Kay et al., 1994; Gupta et al., 1994; Parinaud et al., 1992). In eigenen hier gezeigten Untersuchungen konnte bei maximal 30% der Spermatozoen die Akrosomreaktion induziert werden. Damit kann vermutet werden, dass auch die bovinen Samenzellen, ähnlich den humanen Spermatozoen, nur zu einem relativ geringen Prozentsatz den nicht-genomischen Progesteron-Rezeptor präsentieren (Parinaud et al., 1992). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Beobachtung, dass der dosisabhängige Verlauf der Progesteroninduktion eine deutliche Sättigungscharakteristik hat. In den im Rahmen dieser Dissertation vorgenommenen Untersuchungen wurde ein maximaler Effekt mit Progesteronkonzentrationen von 1-10 $\mu$ M (f.c.) erzielt. Durch die Verwendung höherer Progesteronkonzentrationen konnte der Anteil lebender akrosomreagerter Spermatozoen nicht gesteigert werden. Für einen schnellen, nicht genomischen Effekt spricht auch, dass eine langfristige Zeitabhängigkeit der Progesteron-Inkubation nicht nachgewiesen werden konnte. Schon nach einer 1-minütigen Inkubation mit Progesteron war der Anteil der akrosomreagierten vitalen Spermatozoen signifikant erhöht.

Auch im murinen System ist ein membranständiges Progesteron-bindendes Protein beschrieben worden, das für die progesteroninduzierte Akrosomreaktion von Bedeutung sein könnte (Kwon & Eddy, 1997).

Neben diesen physiologischen Induktoren sind in der Literatur unterschiedliche nicht physiologische Induktoren (im Sinne der oben genannten Definition) beschrieben worden, die eine akrosomale Exozytose induzieren. Von Bedeutung sind hier Lysophosphatidylcholine (PC10-13) (Ehrenwald et al., 1988; Nolan et al., 1992; Graham et al., 1990), sowie Calcium Ionophore (A23187) (Bastiaan et al., 1999). Ihnen gemeinsam ist, dass sie die

---

Membranstruktur oder Calciumfluxe verändern und wahrscheinlich über diesen Mechanismus die Akrosomreaktion induzieren.

In weiteren Untersuchungen wurden im Rahmen der hier vorgelegten Dissertation synthetisierte ZP3 Peptide hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Induktion der Akrosomreaktion getestet. Die Primärstruktur der Zona pellucida Proteine ist aus Untersuchungen der cDNA unterschiedlicher Spezies bekannt (Harris et al, 1994). Damit war es möglich die Aminosäuresequenz des ZP3-Peptides verschiedener Spezies zu vergleichen. Als Kriterium für die Auswahl der hier verwendeten Peptide diente die wahrscheinliche Antigenität der Aminosäuresequenz (Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer beta-turn Region; (Krchnak et al., 1987) und der Konservierungsgrad der einzelnen Sequenzabschnitte. Die Konsensusprimärstruktur wurde aus hochkonservierten Sequenzabschnitten abgeleitet. Der Vergleich mit der ermittelten Konsensusprimärstruktur ergab für das ZP3-5 Peptid eine Übereinstimmung von 93%. Die Aminosäuresequenz des ZP3-6 Peptides entsprach zu 100% der Konsensusprimärstruktur.

Funktionelle Untersuchungen an aufgetauten bovinen Spermatozoen mit synthetischen Zona pellucida Peptiden zeigten, dass das ZP3-6 Peptid, und in geringem Ausmaß auch das ZP3-5 Peptid, die akrosomale Exozytose auslösen konnten. Der Anteil akrosomreagerter Spermatozoen konnte in ähnlichem Ausmaß gesteigert werden, wie dies für die Induktion mit solubilisierten Zona pellucida Proteinen im bovinen System beschrieben worden war (Miller et al., 1990; Florman & First, 1988). Alle anderen getesteten synthetischen Peptide hatten keinen Effekt auf die Akrosomreaktion. In den weiteren Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der Befunde wurde die Spezifität der Induktion der Akrosomreaktion durch das ZP3-6 Peptid untersucht. In den Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch das ZP3-6 Peptid war die akrosomale Exozytose durch Peptidkonzentrationen im Bereich von 1-10 nM auslösbar. Dabei konnte gezeigt werden, dass an den mittels swim-up kapazitierten Spermatozoen um eine Zehnerpotenz niedrigere Peptidkonzentrationen die Akrosomreaktion induzierten. Der Vorteil des Swim-up-Verfahrens liegt in der Selektion der ausschließlich motilen Spermatozoen. Durch dieses Verfahren der Kapazitation konnten sowohl ein niedrigerer Anteil toter akrosomreagerter Samenzellen (degenerative Akrosomreaktion) als auch niedrigere Werte für den Anteil lebender spontan akrosomreagerter Zellen nach Beendigung der Kapazitation in den Spermatozoensuspensionen erzielt werden. Prinzipielle Unterschiede hinsichtlich der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch das ZP3-6 Peptid konnten aber nach der

---

Kapazitation mit und ohne das Swim-up-Verfahren nicht gezeigt werden. Der Nachteil an den durch das Swim-up-Verfahren kapazitierten Spermatozoen liegt in der geringeren Spermatozoendichte bei der Auswertung des Ausstriches.

Nach einer von Roldan et al., 1994 veröffentlichten Arbeit gibt es Hinweise für das Vorliegen eines überadditiven Effektes bezüglich der Induktion der Akrosomreaktion mit Progesteron und Zona pellucida Protein. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Koinkubation mit beiden Induktoren die Entstehung von DAG (Diacylglycerol) PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) und die akrosomale Exozytose gegenüber der alleinigen Inkubation mit Progesteron oder Zona Pellucida Protein erhöht war. Die Entstehung von DAG, welches durch Hydrolyse aus PIP<sub>2</sub> entsteht, wird in der Signaltransduktionskaskade hinter dem Ca-Influx vermutet.

Um zu testen ob dieser überadditive Effekt auch durch die Inkubation mit Progesteron und dem ZP3-6 Peptid zu erzielen war, wurde sowohl eine gleichzeitige Inkubation als auch eine zeitversetzte Inkubation mit beiden Induktoren getestet. Es konnte gezeigt werden, dass sich ein überadditiver Effekt an den kryokonservierten bovinen Spermatozoen nicht erzielen ließ. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass der Anteil lebender akrosomreagerter Spermatozoen nicht beliebig zu steigern, sondern prinzipiell nur ein bestimmter Anteil der Spermatozoen zur akrosomalen Exozytose fähig ist (s.o.).

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei der Maus die Bindung von Spermatozoen an ZP3 und die ZP3-induzierte akrosomale Exozytose funktionell voneinander unterschieden werden können. Die regelrechte Glykosylierung des ZP3-Proteins ist essentiell für die ZP3-Ligandenfunktion (Bleil & Wassarman, 1980), während die erhaltene Integrität der ZP3-Proteinstruktur eine unabdingliche Voraussetzung für das Auslösen der akrosomalen Reaktion ist (Florman & Wassarman, 1985). Für die Bedeutung von auf dem ZP3 Molekül lokalisierten Oligosacchariden spricht, dass eine Inkubation der Spermatozoen mit diesen Oligosacchariden zu einer Hemmung der Spermatozoen-Zona pellucida-Bindung führte (Litscher et al., 1995; Wassarman, 1992). Ein gegen die Polypeptidkette des ZP3-Moldeküs gerichteter monoklonaler Antikörper konnte die Spermatozoen Zona pellucida-Bindung nicht beeinflussen (Florman et al., 1984; Florman et al., 1985).

Dass die Intaktheit des ZP3-Polypeptids eine Voraussetzung für die Induktion der Akrosomreaktion darstellt, zeigten Untersuchungen an durch Proteolyse hergestellten ZP3 Peptiden. Diese konnten zwar an die Plasmamembran des Spermatozoons binden, waren aber nicht in der Lage die akrosomale Reaktion auszulösen. Erst nach einer Verknüpfung der ZP3-

---

Fragmente über eine Antikörperbindung konnte die Akrosomreaktion wieder ausgelöst werden (Florman et al., 1984; Leyton & Saling, 1989).

Die hier vorgelegten Untersuchungen zur Induktion der Akrosomreaktion durch das ZP3-6 Peptid bestätigen die im Maus-System gemachten Beobachtungen für das bovine System. Für die Induktion der Akrosomreaktion scheint die Primärstruktur des ZP3 Proteins entscheidend zu sein und nicht die Glykosylierung, denn sonst wäre die Induktion der Akrosomreaktion durch das ZP3-6 Peptid nicht auslösbar gewesen. Darüber hinaus legen diese Ergebnisse die Interpretation nahe, dass innerhalb des ZP3 Proteins hochkonservierte Sequenzabschnitte für die Induktion der Akrosomreaktion entscheidend sind.

In einer Computeranalyse wurde die wahrscheinliche dreidimensionale Struktur des ZP3-6 Peptids berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 28). Auffällig ist die V-Form dieser thermodynamisch stabilen Konfiguration, die durch einen  $\beta$ -turn im Bereich des Aminosäurerestes Prolin bedingt ist. Die lateralen Regionen des Dekapeptides bestehen aus einem hydrophoben Anteil (Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Leucin) und einem lang gestreckten, hydrophilen Areal (Aspartat, Valin, Threonin, Valin, Glycin), das sich durch ein hohes Potential für Wasserstoffbindungen auszeichnet. Die auffällige Kombination eines hydrophoben und eines hydrophilen Bereiches, die das Peptid auszeichnet, ist gut vereinbar mit der Vorstellung, dass diese Aminosäuresequenz mit einem Rezeptormolekül interagiert. Berücksichtigt man weiterhin, dass das ZP3-6 Peptid zum einen wegen des hochkonservierten Abschnittes der cDNA des ZP3 Proteins ausgewählt wurde und zum anderen dass diese Sequenz ein hohes antigenes Potential hat, so ist es gut vorstellbar, dass dieses Peptid einen oder den Teil des ZP3 Proteins darstellt, der an den noch unbekanntem G-Protein regulierten Spermatozoenrezeptor bindet und die Akrosomreaktion auslöst. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Glykosylierung des ZP3 Proteins für den ersten Kontakt (primäres binding) der Spermatozoen Eizell-Interaktion entscheidend ist.



Abb. 28

*Struktur des ZP3-6 Peptides nach dem Qian-Sejnowski-Computermodell.*

Die Induktion der Akrosomreaktion durch ZP3-6 Peptid war durch Vorbehandlung der Spermatozoen mit Pertussistoxin hemmbar. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei dem ZP3-6 Peptid-Effekt um einen Rezeptor-vermittelten, G-Protein-modulierten, transmembranären Signaltransduktionsmechanismus handelt, der zur akrosomalen Exozytose führt. Die Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Kopf et al. (1986), in denen für mit ZP3-Protein und mit Pertussistoxin behandelte Spermatozoen erstmals gezeigt wurde, dass die Aktivierung von G-Proteinen der  $G_i$  Subklasse als signal-transduzierendes Element distal der ZP3-Spermatozoen-Rezeptor-Interaktion zu sehen ist. Als Folge der Aktivierung Pertussis-Toxin-sensitiver G-Proteine kommt es zu einem Kalziuminflux und zu einer transienten Erhöhung des intrazellulären pH Wertes (Florman et al., 1989). Ähnliche Effekte wurden mit einem weiteren physiologischen Induktor der Akrosomreaktion beobachtet, dem Progesteron (Thomas & Meizel, 1988). Es konnte aber von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass es sich hier um einen zweiten, ZP3-Protein unabhängigen und Pertussis-Toxin-insensitiven Weg handelt (Blackmore et al., 1991; Tesarik et al., 1993). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass im Gegensatz zum ZP3-6 Peptid als Induktor die Vorbehandlung boviner Spermatozoen mit Pertussistoxin keinen negativen Effekt auf die Progesteron-induzierte Akrosomreaktion hatte.

### **Ausblick**

Weitere Untersuchungen zur pharmakologischen und biochemischen Charakterisierung des bisher noch nicht identifizierten G-Protein-regulierten Spermatozoen-Rezeptors sind notwendig. Eine Möglichkeit ist die biochemische Anreicherung des ZP3-Protein Rezeptors über immobilisiertes ZP3-6 Peptid mittels Affinitätschromatographie. Des weiteren kann untersucht werden, ob durch Modifikation der Aminosäuresequenz (z.B. „Punktmutationen“) des Dekapeptids, wie z.B. dem Austausch von Prolin in Position 6 durch Leucin, die Akrosomreaktion noch induziert werden kann oder nicht. Eine derartige Änderung der Primärstruktur des ZP3-6 Peptides hätte einen entscheidenden Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptides. Nach Berechnung der Sekundärstruktur dieses Peptides nach dem Qian-Sejnowski-ComputermodeLL würde der  $\beta$ -turn wegfallen und das Peptid gestreckt erscheinen. Mit diesen Untersuchungen kann überprüft werden, ob die dreidimensionale V-Struktur des ZP3-6 Peptides für das Auslösen der Akrosomreaktion von Bedeutung ist oder nicht.

## **6 Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Induktion der Akrosomreaktion an kryokonservierten bovinen Spermatozoen untersucht. Es wurden kryokonservierte bovine Spermatozoen und optimierte Kapazitationsmedien eingesetzt, um die bestmögliche Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen.

Die Akrosomreaktion wurde mit dem als physiologischen Induktor bekannten Progesteron induziert. In Übereinstimmung mit Literaturangaben liegt die maximale Wirkungsstärke nach Induktion mit Progesteron bei ca. 25-30% lebender akrosomreagerter Spermatozoen. Dieser Effekt wurde mit Konzentrationen  $>1\mu\text{M}$  Progesteron erreicht. Dementsprechend kann die durch Progesteron induzierte Akrosomreaktion als Rezeptor gesteuert interpretiert werden.

Mit diesen Vorversuchen stand ein Testsystem zur Verfügung, welches es ermöglichte reproduzierbar andere Substanzen hinsichtlich ihrer Potenz die Akrosomreaktion zu induzieren zu testen.

Aus Literaturangaben ist bekannt, dass Zona pellucida Proteine die Akrosomreaktion induzieren. Bezogen auf das Maussystem gibt es weiterhin Hinweise dafür, dass die Spermatozoen-Eizell Bindung wesentlich von der Glykosylierung des ZP-3 Proteins abhängig ist; für die Induktion der Akrosomreaktion ist aber die Proteinstruktur entscheidend.

Um dies im bovinen System zu überprüfen, wurde das ZP3-6 Peptid synthetisiert, das einen hochkonservierten Sequenzabschnitt im Säuger-ZP3-Protein entspricht. Nach Untersuchungen zur Dosisfindung zeigte sich, dass die Akrosomreaktion mit ähnlichen Konzentrationen wie sie aus den Experimenten mit Progesteron bekannt waren induziert werden konnte. Eine weitere Parallele zum Progesteron bot die beobachtete Sättigungscharakteristik. Durch Konzentrationen  $>1\mu\text{M}$  stieg der Anteil lebender akrosomreagerter Spermatozoen nicht weiter an, und auch die maximale Wirkungsstärke entsprach der bei der Induktion durch Progesteron beobachteten Konzentration.

In ergänzenden Experimenten wurde untersucht, ob weitere Proteine an der Signaltransduktion der rezeptor-vermittelten Spermatozoen-Eizell-Interaktion beteiligt sind. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Induktion der Akrosomreaktion der Spermatozoen nach Vorbehandlung mit Pertussistoxin nicht mehr möglich war. Dies ist Hinweis dafür, dass auch bei bovinen Spermatozoen Pertussistoxin-sensitive G-Proteine ( $G_i$  Subklasse) am Signaltransduktionsmechanismus beteiligt sind.

---

Die Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron konnte mit einer Vorbehandlung durch Pertussistoxin nicht beeinflusst werden. Dies bedeutet, dass im bovinen System die Signaltransduktion nach Rezeptor-Ligandenbindung anders weiter vermittelt wird als bei der ZP3-induzierten akrosomalen Exozytose.

Detaillierte Kenntnisse um die Identität der ZP3-Domäne und des ZP3-Rezeptormoleküls, die als Ligand-Rezeptorkomplex für die Induktion der Akrosomreaktion relevant sind, haben eine weitreichende Bedeutung für das Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie der Spermatozoen-Eizell-Interaktion. Neue Erkenntnisse über molekulare Mechanismen der Fertilisierung könnten einerseits Grundlage für die Behandlung und Diagnostik in der Reproduktionsmedizin, andererseits aber auch für die Entwicklung innovativer Kontrazeptiva für Mensch und Tier von Bedeutung sein.

---

## 7 Literaturverzeichnis

Ambhaikar, M., Puri, C.: Cell surface binding sites for progesterone on human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 4 (5), 413-21, 1998.

Araki, Y., Orgebin-Christ, M.C., Tulsiani, D.R.P.: Qualitative characterization of oligosaccharide chains present on the rat zona pellucida glycoconjugates. *Biol Reprod* (46), 912-919, 1992.

Baccetti B. The human spermatozoon, In: Van Blerkam J, Motta PM, eds. *Ultrastructure of reproduction*. The Hague: Marinus Nijhoff;: 110-126, 1998.

Bailey, J., Storey, B.: Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, Fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: Tyrphostin A48, Pertussis Toxin, and 3-Yuninuclidinyl Benzuilate. *Mol Reprod Dev* (39), 297-308, 1994.

Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Maggi, M., Francavill, S., Gabriele, A., Properzi, G., Forti, G.: Nongenomic progesterone receptor on human spermatozoa: biochemical aspects and clinical implications. *Steroids* 64 (1-2), 143-148, 1999.

Barany, G., Merrifield, R.B.: A chromatographic method for the quantitative analysis of the deprotection of dithiasuccinoyl (Dts) amino acids. *Anal Biochem* (95), 160-170, 1979.

Barros, C., Capote, C., Perez, C., Crosby, J.A., Becker, M., De Ioannes, A.: Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-peg and human spermatozoa. *Biol Res (Chile)* (25), 31-40, 1992.

Barros, C., Yanagimachi, R.: Induction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* (233), 268-269, 1971

Bastiaan, H., Franken, D., Wranz, P.: G-protein regulation of the solubilized human zona pellucida-mediated acrosome reaction and zona pellucida binding. *J Assist Reprod Genet* 16(6), 332-6, 1999.

- 
- Blackmore, P., Neulen, Lattanzio, Beebe: Cell surfacebinding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* (266) 18655-18659, 1991.
- Blackmore, P.F., Eisoldt, S.: The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 5(6), 498-506, 1999.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol* (102), 1363-1371, 1986.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc Nat Acad Sci USA* (87), 5563-5567, 1990.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* (20), 873-882, 1980.
- Brewis, I.A., Clyton, R., Browes, C.E., Martin, M., Barratt, C.L., Hornby, D.P., Moore, H.D.: Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3. *Mol Hum Reprod* 4(12), 1136-44, 1998.
- Bronson, R.A., Peresleni, T., Golightly, M.: Progesterone promotes the acrosome reaction in capacitated human spermatozoa as judged by flow cytometry and CD 46 staining. *Mol Hum Reprod* 5(6), 507-512, 1999.
- Bucher, O., Wartenberg, H.: *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 11. Auflage, Verlag Hans Huber, Bern, 520-531, 1989
- Burks, D.J., Carballada, R., Moore, H.D., Saling, P.M.: Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Csinnence* (5220), 83-6, 1995.
- Chamberlin, M.E., Dean, J.: Human homolog of the mouse sperm receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* (87), 6014-6018, 1990.
- Cheng, F.P., Gadella, B.M., Voorhout, W.F., Fazeli, A., Bevers, M.M., Colenbrander B.: Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by plasma

---

membrane progesterone receptor. *Bio Reprod* 59(4), 733-742, 1998.

Cordoba, M., Santa-Coloma, T.A., Beorlegui, N.B., Beconi, M.T.: Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm. *Biochem Mol Biol Int* 41(4), 725-33, 1997.

Cormier, N., Sirard, M.A., Bailey, J.L.: Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18(4), 461-8, 1997.

Cross, N., Morales, P., Overstreet, J.W., Hanson, F.W.: Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research* (15), 213-226, 1986.

Cross, N.L., Meizel, S.: Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* (41), 635-641, 1989.

Cross, N.L., Overstreet, J. W.: Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. *Gamete Research* (16), 23-35, 1987.

Didion, B.A., Graves, D.N.: Influence of calcium on the true acrosome reaction on capacity of bull spermatozoa to penetrate oocytes in vitro. *J Dairy Sci* (72) 1540-1546, 1989.

Dunbar, B.S., Prasad, S.V., Timmons, T.M.: Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae. In: Dunbar BS, O'Rand Mgeds. *A Comparative Overview of mammalian fertilization*. New York: Plenum Press, 97-114, 1991

Dunbar, B.S.: Morphological, biochemical, and immunochemical characterization of the mammalian zona pellucida, in: J.F. Hartmann (ed): *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Academic Press, New York, 139-157, 1983.

Ehrenwald, E., Parks, J.E., Foote, R.H.: Cholesterol efflux from bovine sperm. 1. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Research*(20) 145-157, 1988.

Endo, Y., Lee, M.A., Kopf, G.S.: Characterization of an islet-activating protein-sensitive site in mouse sperm that is in the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Dev Biol* 129(1), 12-24, 1988.

Epifano, O., Dean, J.: Biology and structure of the zona pellucida: a target for

---

immuncontraception. *Reprod Fertil Dev* (6), 319-330, 1994.

Farrell, P.B., Foote, R.H., Mc Ardle, M.M., Trouern-Trend VL, Tardif, A.L.: Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer assisted sperm analysis (CASA). *J Androl* 17(3), 293-300, 1996.

Fehl, P., Miska, W., Henkel, R.: Further indications of the multicomponent nature of the acrosome reaction-inducing substance of human follicular fluid. *Mol Reprod Dev* (42), 80-88, 1995.

Florman, H., Bechtal, K., Wassarman, P.M.: Enzymatic dissection of the fractions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev Biol* (106), 243-255, 1984.

Florman, H., First N.L.: Regulation of acrosomal exocytosis. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev Bio.*; (128) 464-473, 1988.

Florman, H., First, N.L.: Regulation of acrosomal exocytosis. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev Biol* (128) 453-463, 1988.

Florman, H.M., Tombes, R.M., First, N.L., Babcock, D.F.: An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevation of internal Ca and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol* (135), 133-146, 1989.

Florman, H.M., Wassarman, P.M.: O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* (41) 313-324, 1985.

Fraser, L.R., Dermott, C.A.: Ca<sup>2+</sup>-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Reprod Fertil* (96) 363-377, 1992.

Fraser, L.R.: Calcium channels play a pivotal role in the sequence of ionic changes involved in initiating mouse sperm acrosomal exocytosis. *Mol Reprod Dev* (36) 368-376, 1993.

Fraser, L.R.: Ionic control of sperm function. *Reprod Fertil Def* 7(4), 905-925, 1995.

Fraser, L.R.: Na<sup>+</sup> requirements for capacitation and acrosomal exocytosis in mammalian

---

sperm. *Int Rev Cytol* (149) 1-46, 1994.

Garcia, M.A., Meizel, S.: Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Mol Reprod Dev* 52(2), 189-95, 1999.

Garty, N.B., Galiani, D., Aharonheim, A., Ho, Y.K., Phillip, D.M., Dekel, N., Salomon, Y.: G-proteins in mammalian gametes: an immunocytochemical study. *J Cell Sci* 91 (PT1), 21-31, 1988.

Gilman A.G.: G Proteins transducers of receptor generated signals. *Ann Rev Biochem* (56) 615-649, 1987.

Glassner, M., Jones, J., Kligman, I., Molkalis, M.J., Gerton, G.L., Kopf, G.S.: Immunocytochemical and biochemical characterization of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Dev Biol* 146 (2), 438-450, 1991.

Graham, J.K., Kunze, I., Hammerstedt, R.H.: Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* (43), 55-64, 1990.

Grosse: Atlas of human spermiogenesis. Berlin 1981.

Gunderson, G.G., Shapiro, B.M.: Sperm surface proteins persist after fertilization. *J Cell Biol* (99), 1343-1353, 1984.

Gupta, S., Mills, C., Fraser, L.: A possible role for  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in human sperm capacitation. *J Reprod Fertil* (102) 107-116, 1994.

Harris, J., Hibler, D., Fontemot, G., Hsiu, K., Yurewicz, E., Sacco, A.: Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families DNA sequence. *J Sequen Map* (4), 361-393, 1994.

Harrison, Gadella: Membrane changes during capacitation with special reference to lipid architecture. Human sperm acrosome reaction. Des P. Fenichel, J. Parinaud. Colloque INSERM / John Libbey Eurotext Ltd 1995. Vol 236, pp. 45-65.

Hewitt, D.A., England, G.C.: An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim Reprod Sci* 51(4), 321-32,

1998.

Hinsch E, Hinsch KD, Boehm JG, Schill WB, Mueller-Schloesser F: Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. *Reprod Dom Anim*, (32) 143-149, 1997.

Hinsch, E., Ponce, A.A., Hägele, W., Hedrich, F., Müller-Schlosser, F., Schill, W.B, Hinsch, K.D.: A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. *Hum Reprod* 12(8), 1673-81, 1997.

Holt, W.V., North, R.D.: thermotropic phase transition in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* (78), 447-457, 1986.

Jansen, S., Jones, R., Jenneckens, I., Marschall, B., Kriegesmann, B., Coadwell, J., Brenig, B.: Site-directed mutagenesis of boar proacrosin reveals residues involved in binding of zona glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 1998 51(2), 184-92, 1998

Jansen, S., Quigley, M., Reik, W., Jones, R.: Analysis of polysulfate-binding domains in porcine proacrosin, a putative zona adhesion protein from mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol* (39), 501-510, 1995.

Kay, F.J., Coutts, J.R.T., Robertson, L.: Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction. *Hum Reprod* vol9 (12), 2318-2323, 1994.

Kholkute, S.K., Rodriguez, J., Dukelow, W.R.: In vitro fertilization and the effect of progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone on acrosome reaction of mouse epididymal spermatozoa. *Int J Androl* 18(3), 146-50, 1995.

Kinloch, R., Ruiz-Seiler, B., Wassarman, P.M.: Genomic organization and polypeptide primary structure of zona pellucida glycoprotein hZP3, the hamster sperm receptor. *Dev Bio.* (142), 414-421, 1990.

Kopf G.S., Gerton, G.L.: The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: Wassarman PM, ed. *Elements of Mammalian Fertilization. I. Basic Concepts*. Boca Raton, FL: CRC Press, 153-203, 1991.

Kopf, G.S., Woolkalis, M.J., Gerton, G.L.: Evidence for a guanine nucleotide-binding

---

regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm: identification by islet-activating protein catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods. *J Biol Chem* (261), 7327-7331, 1986.

Kopf, G.S.: Zona pellucida mediated signal transduction in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* (42), 33-49, 1990.

Krchnak, V., Mach, O., Maly, A.: Computer prediction of potential immunogenic determinants from protein amino acid sequence. *Anal Biochem* (165), 200-207, 1987.

Kuroda, Y., Kaneko, S., Yoshimura, Y., Nozawa, S., Mikoshiba.: Influence of progesterone and GABAA receptor on calcium mobilization during human sperm acrosome reaction. *Arch Androl* 42(3), 185-191, 1999.

Kusan, F., Flemming, A.D., Seidel, G.: Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome reacted) spermatozoa in the rabbit. *Fertil Steril.* (41) 766-770, 1984.

Kwon, S., Eddy, E.M.: The expression of a membrane associated progesterone receptor (MAPR) in the male mouse reproduction system. Abstract, Cell Biology Meeting, Washington DC, USA, December 97.

Laemmli, ZU.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature (London)* (277), 680-685, 1970.

Lane, M., Therien, I., Moreau, R., Manjunath, P.: Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol Reprod* 60(1), 169-75, 1999.

Lardy, H., San Agustin, J.: Caltrin and calcium regulation of sperm activity. In Schatten H, Schatten G, eds. *The Cell Biology of Fertilization*. New York: Academic Press 29-39, 1989

Lee, M., Schwoebel, E., Prasad, S., Cheung, P., Timmons, T., Cook, R., Dunbar, B.S.: Identification and structural characterization of the 75kDa rabbit zona pellucida protein. *J Biol Chem* (286), 12412-12417, 1993.

Lee, M.I, Kopf, G. Storey, B.: Effects of phorbol esters and a diacylglycerol on the mouse

---

sperm acrosome reaction induced by the zona pellucida. *Biol Reprod* (36), 617-627, 1987.

Leyton, L., Saling, P.: 95 kDa sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* (57) 1123-1130, 1989.

Leyton, L., Saling, P.: Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol* (108) 2163-2168, 1989.

Liang, L., Dean, J.: Conservation of mammalian secondary sperm receptor genes enables the promoter of the human gene to function in mouse oocytes. *Dev Biol* (156) 399-408, 1993.

Liang, L., Chamow, S.M., Dean, J.: Oocyte-specific expression of mouse ZP2: developmental regulation of the zona pellucida genes. *Mol Cell Biol* (10), 1507-1518, 1990.

Litscher, E.S., Juntunen, K., Seppo, A., Penttila, L., Niemela, R., Renkonen, O., Wassarman, P.M.: Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro. *Biochemistry* (34) 4662-4669, 1995.

Lui, C.W., Cornet, L.E., Meizel, S.: Identification of the bovine follicular fluid protein involved in the in vitro induction of the hamster sperm acrosome reaction. *Biol Reprod* (17) 34-41, 1977.

Maresh, G.A., Dunbar, B.S.: Antigenic comparison of five species of mammalian zonae pellucidae. *J Exp Zool* (244), 299-307, 1987.

Margalit, I., Rubinstein, S., Breitbart, H.: A novel method for evaluating the acrosomal status of mammalian spermatozoa. *Arch Androl* 39(2), 87-99, 1997.

Miller, C.C., Fayer-Hosken, R.A., Timmons, T.M., Lee, V.H., Caudle, A.B., Dunbar, B.S.: Characterization of equine zona pellucida glycoproteins by polyacrylamid gel electrophoresis and immunological techniques. *J Reprod Fertil* (96), 815-825, 1992.

Miller, D., Winer, M., Ax, R.: Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* (42) 899-915, 1990.

Moor, K.L.: Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen, 2. Auflage. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 19-20, 1985.

---

Müller-Schlösser F, Hinsch E, Böhm J, Schill W-B, Hinsch KD: Untersuchungen an einem eidotterfreien Verdünnungsmedium für die Tiefgefrier-Konservierung von Buooensperma. *Tierärztl Prax* (23) 363-366, 1995.

Murase, T., Roldan, E.R.: Progesterone and the zona pellucida activate different trasducing pathways in the sequence of events leading zo dacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis. *Biochem J (Pt3)*, 320, 1017-23, 19996.

Ning, X., Ward, C.R., Kopf, G.S.: Activation of Gi protein in digitonin/cholate solubilized membrane preparations of mouse sperm by the zona pellucida an egg spezific extracellular matrix. *Mol Reprod Dev* 40 (3), 355-363, 1995.

Nolan, J.P., Graham, J.K., Hammerstedt, R.H.: Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Arch Biochem Bioph* (292), 311-322, 1992.

Olson, G., Winfrey, V.: Mitochondria - cytoskeletal interactions in the sperm midpiese. *J Struct Biol* (103), 13-22, 1990.

Osheroff, J.e., Visconti, P,E., Valenzuela, J.P., Travis, J.J., Alvarez, J., Kopf, G.S.: Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signa transducing pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 5(11), 1017-1026, 1999.

Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D., Meizel, S.: Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Beiochem. Biophys. Res. Commun.*,160(2), 828-833, 1989.

Parinaud, J., Labal, B., Vietitez, G.: High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. *Fertil Steril* (58), 599-602, 1992.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., First, N.L.: Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod.* (41) 683-699, 1989.

Phelps, B.M., Koppel, D.E., Primakoff, P., Myles, D.G.: Evidence that proteolysis of surface ist in initial step of formation of sperm cell surfacedomains. *J Cell Biol* 111 (5PT1) 1839-47, 1990.

Pillai, M.C., Meizel, S.: Trypsin inhibitors prevent the progesterone-initiated increase in

- 
- intracellular calcium required for the human sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* (258) 384-393, 1991.
- Ringuette, M.J., Sobieski, D.A., Chomow, S.M., Dean, J.: Oocyte-specific gene expression: molecular characterization of a cDNA coding for Zpe, the sperm receptor of the mouse and zona pellucida. *Proc Nat Acad Sci USA* (83), 4341-4345, 1986.
- Roldan, E., Murase, T., Qi-Xian, S.: Exocytosis in Spermatozoa in Response to Progesterone and Zona Pellucida. *Science* Vol 266, 2 December 1994.
- Rüsse, I., Sinowatz, F.: *Lehrbuch der Embryologie der Huastiere*. Parcy, Berlin/Hamburg, 18-32, 1991.
- Sabeur, K., Edwards, D.P., Meizel, S.: Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 54(5), 993-1001, 1996.
- Saling, P.M.: Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf Ref Reprod Biol* (11), 339-388, 1989.
- Schwoebel, E., Prasad, S., Timmons, T., Cook, R., Kimura, H., Dunbar, B.S.: Isolation and characterization of a full length cDNA encoding the 55 kDa rabbit zona pellucida protein. *J Biol Chem* (266), 7214-7219, 1991.
- Shabanowitz, R.B., O'Rand, M.G.: Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J Reprod Fertil* (82), 151-161, 1988.
- Sillerico, T., Valdivia, M., de Ioannes, A., Barros, C.: Proacrosin and acrosin determination during capacitation and acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Biocell* 20(2), 133-142, 1996.
- Stevens, R.W.: Basic spermatozoon anatomy and physiology for the clinician, in: A.A. Acosta, R.J. Swanson, S.B. Ackerman, T.F. Kruger, J.A. van Zyl, R. Menkveld (eds): *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1990, 1-23.
- Talbot, P., Chacon, R.: A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *Gamete Res* (3), 211-216, 1980.

---

Tesarik, J., Carrera, A., Mendoza, C.: Differential sensitivity of progesterone and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin. *Mol Reprod Dev* 34, 183-9, 1993.

Tesarik, J., Mendoza, C., Moos, J., Carreras, A.: Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil Steril* (58) 784-792, 1992.

Tesarik, J., Drahorad J., Peknicova J.: Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertil Steril*, (50) 133-141, 1988.

Thibier, M., Guerin, B.: Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62(1-3), 233-51, 2000.

Thillai-Koothan, P., Van Duin, M., Aitken, R.: Cloning, sequencing and oocyte-specific expression of the marmoset sperm receptor protein ZP3. *Zygote* (2), 1-19, 1993.

Thomas, P., Meizel, S.: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon  $Ca^{2+}$  influx. *Gamete Res* (20), 397-341, 1988.

Töpfer-Petersen, E., Cechova, D.: Zona pellucida induces conversion of proacrosin, to acrosin. *Int J Androl*. (13) 190-196, 1990.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* (76), 4350-4354, 1979.

Tumer, K.Co., Garcia, M.A., Meizel, S.: Progesterone-initiation of the human sperm acrosome reaction: the obligatory increase in intracellular calcium is independent of the chloride requirement. *Mol Cell Endocrinol* (101), 221-225, 1994.

Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S.: Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* (4), 1129-37, 1995.

Visconti, P.E., Ning, X., Fornes, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A., Kopf, G.S.: Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release

---

signals an increase in protein-tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214(2), 429-434, 1999.

Vredenburg-Wilberg, W.L., Parrish, J.J.: Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev* (40), 490-502, 1995.

Wang, W.H., Abeydeera, L-R., Fraser, L.R., Niwa, K.: Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* (2)104, 305-313, 1995.

Ward, C., Kopf, G.S., Storey, B.: Solubilization and partial purification from mouse sperm membranes of the specific binding activity for 3-Quinuclidinyl Benzilate, a potent inhibitor of the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* (39), 423-432, 1994.

Wassarman, P.M. Albertini, D.F.: The mammalian ovum, in: E. Knobil, J.D. Neill (des.): *The physiology of Reproduction*, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York, 79-122, 1994.

Wassarman, P.M.: Gamete interactions during mammalian fertilization. *Theriogenology* (41) 31-44, 1994.

Wassarman, P.M.: Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* (46), 186-191, 1992.

Wassarman, P.M.: Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil* (42) 79-87, 1990.

Wassarman, P.M.: Towards molecular mechanisms for gamete adhesion and fusion during mammalian fertilization. *Curr Opin Cell Biol* (7), 658-664, 1995.

White, D.R., Aitken, F.J.: Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* (22) 163-177, 1989.

Wistrom, C.A., Meizel, S.: Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/CL channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* (159) 679-690, 1993.

Yanagimachi,R.: Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD eds. The Physiology of - Reproduction, 2nd edition. New York: Raven Press, 189-137, 1994.

Yurewicz, E., Hibler, D., Fontenot, G., Sacco, A., Harris, J.: Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3a, a spermbinding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte. *Biochem Biophys Acta* (1174), 211-214, 1993.

Zhao, Y., Buhr, M.M.: Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. *J Androl* 16(3), 278-285, 1995.