

Aus dem
Zentrum für Dermatologie und Andrologie
der **Justus-Liebig-Universität Gießen**

Einfluss von Umweltsubstanzen auf die Spermatozoenfunktion

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
(Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Viviana Andrea Aires
aus Córdoba, Argentinien

Gießen 2002

Dekan: Prof. Dr. J. Janek
1. Gutachter: Prof. Dr. F. Jauker
2. Gutachter: PD Dr. K.-D. Hinsch

Tag der mündlichen Prüfung:

meiner Mutter,
Daniela, Lara, Marcos,
Martin

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ALH	<i>Amplitude of Lateral Head displacement</i> Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung
Aqua dest.	destilliertes, demineralisiertes Wasser
AR	Akrosomreaktion
BSA	bovines Serumalbumin
dbcAMP	Dibutyryl-Cyclo-Adenosinmonophosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fc	<i>final concentration</i> Endkonzentration
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
H258	bis-Benzimide, Hoechst 33258
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSA	<i>Pisum sativum</i> Agglutinin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	<i>tris buffered saline</i> Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethyldiamid
Tris	Tetra-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VAP	<i>Velocity of Average Path</i> mittlere Weggeschwindigkeit
VCL	<i>Velocity of Curved Line</i> Kurvenliniengeschwindigkeit
VSL	<i>Velocity of Straight Line</i> gerade Weggeschwindigkeit
v/v	<i>volume per volume</i> Volumen pro Volumeneinheit
w/v	<i>weight per volume</i> Gewicht pro Volumeneinheit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Zielsetzung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Untersuchungsmaterial	11
2.2	Gewinnung des Untersuchungsmaterials	12
2.2.1	Ejakulate	12
2.2.2	Kryokonservierung	13
2.3	Aufbereitung der Spermatozoen durch das Swim-up-Verfahren	14
2.4	Aufbereitung der Spermatozoen durch Glaswollsäule-Filtration	16
2.5	Funktionelle Untersuchungen	17
2.5.1	Motilitätsmessung	17
2.5.2	Vitalitätsuntersuchung und Evaluierung des akrosomalen Status	19
2.5.3	Untersuchung des akrosomalen Status und Induzierbarkeit der Akrosomreaktion	21
2.6	Einfluss von Genistein auf Motilität, Vitalität und Induzierbarkeit der Akrosomreaktion boviner Spermatozoen	23
2.7	Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot	26
2.7.1	Aufbereitung der Spermatozoen zur Proteinextraktion	26
2.7.2	Durchführung der Gelelektrophorese und des Western Blots	30
2.7.3	Immunbiochemische Identifizierung phosphorylierter Proteine in bovinen Spermatozoenextrakten	31
2.7.4	Verwendete Lösungen und Materialien für die Elektrophorese und den Western Blot	33
2.8	Chlortetracyclin-Analyse (CTC)	35
2.8.1	Verwendete Lösungen für die CTC-Analyse	37
2.9	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Kryokonservierung boviner Spermatozoen	39
3.1.1	Motilitätsmessung	39
3.1.2	Induktion der Akrosomreaktion in kryokonservierten Spermatozoen nach dem Swim-up-Verfahren	41
3.1.3	Induktion der Akrosomreaktion in kryokonservierten Spermatozoen nach Glaswollsäule-Filtration	44
3.2	Einfluss von Genistein auf die Spermatozoenfunktion	46

3.2.1	Motilitätsmessung	46
3.2.2	Vitalität	47
3.2.3	Induzierbarkeit der Akrosomreaktion	49
3.3	Proteinphosphorylierung während der Kapazitation	52
3.3.1	Einfluss von Kapazitationsmedium und Genistein auf die Tyrosinphosphorylierung	53
3.4	Chlortetracyclin-Analyse	58
4	Diskussion	61
4.1	Umweltbedingte Unfruchtbarkeit	61
4.2	Umwelttoxene und männliche Infertilität	62
4.3	Reproduktionstoxikologische <i>in vitro</i> -Untersuchungen	63
4.4	<i>In vitro</i> -Modelle zur Evaluierung von Spermatozoenfunktionen	64
4.5	Motilitätsmessung mit der Computer-assistierten Spermatozoen-Bewegungsanalyse (CASA)	66
4.6	Aufbereitung von kryokonservierten bovinen Spermatozoen	67
4.7	Induktion und Messung der Akrosomreaktion	67
4.8	Genistein als Testsubstanz für umweltbedingte männliche Infertilität	68
4.9	Molekulare Basis der Kapazitation	69
4.9.1	Signaltransduktionsweg A: Rolle von Bestandteilen des Kapazitationsmediums	71
4.9.2	Signaltransduktionsweg B: Effektoren und intrazelluläre „second messengers“	73
4.10	Funktionelle Tests zur Untersuchung der Kapazitation	76
4.10.1	Chlortetracyclin-Fluoreszenz-Analyse	76
4.10.2	Akrosomreaktion	78
5	Zusammenfassung	86
6	Abstract	87
	Literaturverzeichnis	88
A	Anhang	106
A.1	Danksagung	106
B	Veröffentlichungen im Rahmen der Doktorarbeit	108
B.1	Originalarbeiten	108
B.2	Buchbeiträge	108
B.3	Publizierte Abstracts	108
C	Lebenslauf	110
	Stichwortverzeichnis	111

Forschung bedeutet, zu sehen, was alle anderen auch sehen, und zu denken, was noch niemand gedacht hat

Albert Szent-Györgyi (1893 - 1986)

1 Einleitung

Säuigerspermatozoen sind freibewegliche Zellen, die aus einem Kopf und einem Flagellum bestehen. Ihre Aufgabe ist es, einen haploiden männlichen Chromosomensatz durch den weiblichen Genitaltrakt zu transportieren und anschließend eine Eizelle zu befruchten. Eine erfolgreiche Befruchtung erfolgt nur dann, wenn die Gameten vollständig entwickelt und gereift sind und somit die Kompetenz zur Befruchtung erlangt haben. Dazu unterliegen die Säuigerspermatozoen auch nach ihrer Entwicklung im Hoden (Spermatogenese und Spermiogenese) kontinuierlichen biochemischen und funktionellen Veränderungen. Nach der Passage durch den Nebenhoden haben die Spermatozoen die Fähigkeit erlangt, sich progressiv fortzubewegen. Sie besitzen aber noch nicht die Kompetenz, eine Eizelle zu befruchten. Diese erlangen die ejakulierte Spermatozoen erst während ihrer Passage durch den weiblichen Genitaltrakt [40, 196]. Dort kommt es zu biochemischen Veränderungen, die unter anderem zu einer Reorganisation und Modifikation der Plasmamembran sowie der mit ihr assoziierten Proteine führen [59]. Diese vielfältigen, zum Teil noch unbekanntem physiologischen Vorgänge im weiblichen Genitaltrakt, die sich bei den verschiedenen Spezies zu unterscheiden scheinen, werden zusammenfassend als Kapazitation bezeichnet.

Einheitliche Parameter zur Definierung des Kapazitationsstatus von Spermatozoen konnten bisher noch nicht aufgestellt werden. Das Ende der Kapazitation zeichnet sich bei allem Säugetieren dadurch aus, dass das Spermatozoon den Cumulus oophorus passiert und die Zona pellucida zu durchdringen vermag.

Die Fähigkeit der Spermatozoen zur spontanen Akrosomreaktion, die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch Effektoren wie Progesteron oder Zona pellucida-Proteine und das Auftreten eines hyperaktiven Bewegungsmusters des Flagellums werden als Parameter für eine erfolgte Kapazitation gewertet [83]. Weiterhin können Veränderungen des Lipidgehaltes auf der Spermatozoenoberfläche [83] und die Tyrosinphosphorylierung

bestimmter Proteine [4, 75, 100, 130, 167] auf eine Kapazitation hinweisen. An der Regulation der Kapazitation sind eine Reihe von Ionen beteiligt. Während dieses Prozesses verändert sich im Spermatozoon die intrazelluläre Konzentration von Calcium, Natrium, Kalium und Bikarbonat [196].

Die Akrosomreaktion ist ein exozytotischer Prozess, bei dem die äußere Membran des Akrosoms mit der Plasmamembran, die den Spermatozoonkopf umgibt, fusioniert. Durch die Calciumabhängige multiple Fusion und Vesikulisierung der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran werden proteolytische Enzyme aus dem Akrosom freigesetzt. Diese unterstützen die Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida, um anschließend die Eizelle zu befruchten [196].

Es gibt bisher noch keine einheitliche Hypothese über den genauen molekularen Mechanismus des Ablaufs der Akrosomreaktion. Zunächst kommt es bei einem Prozess, der als primäre Bindung bezeichnet wird, zu einem Kontakt zwischen dem Spermatozoon und der Zona pellucida. In einem zweiten, wahrscheinlich von der primären Bindung unabhängigen Prozess wird die Akrosomreaktion induziert. Das ZP3-Protein scheint sowohl an der primären Bindung als auch an der Induktion der Akrosomreaktion beteiligt zu sein [100]. Es ist noch nicht klar, welche Moleküle der Plasmamembran des Spermatozoons in der Interaktion mit der Zona pellucida involviert sind. Ein 95kDa schweres Protein, das als Tyrosinkinase-Rezeptor charakterisiert wurde, und die β -1,4-Galactosyltransferase werden als Schlüsselmoleküle in der Plasmamembran des Spermatozoons diskutiert [36, 114, 123]. Neben dem ZP3-Protein in der Zona pellucida wird Progesteron, das in der Flüssigkeit des Eileiters vorkommt, als ein möglicher Induktor der Akrosomreaktion angesehen [121, 147]. Bezüglich der Akrosomreaktion wurden in Spermatozoen G_i -Proteine nachgewiesen, die wahrscheinlich über das ZP3-Protein, aber nicht über die Progesteron induzierte akrosomale Exozytose aktiviert werden [100]. Als „second messenger“ Systeme sind u.a. Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) sowie cAMP an der Akrosomreaktion beteiligt [56, 196]. Wahrscheinlich führt letztlich die Kombination verschiedener Signaltransduktionswege zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle. Die Summe dieser Ereignisse soll schließlich die Akrosomreaktion auslösen.

Die Beobachtung des Anstiegs von Unfruchtbarkeit bei Mensch und Tier und die zunehmende Belastung unserer Umwelt hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass ein-

geschränkte Fruchtbarkeit und negative Umwelteinflüsse kausal miteinander verknüpft werden. Daraus ergibt sich folgerichtig die Forderung, dass eine vermeintliche Problematik hinsichtlich „Umwelt und Reproduktion“ in die Forschung mit einbezogen und den entsprechenden Fragestellungen mit naturwissenschaftlich fundierten Methoden nachgegangen werden muss [112].

Eine Reihe von im wesentlichen epidemiologisch orientierten Publikationen weist auf mögliche Zusammenhänge von Umwelteinflüssen und der Beeinträchtigung männlicher Infertilität hin [38]. Diese Hypothesen werden zur Zeit kontrovers diskutiert, denn retrospektive epidemiologische Untersuchungen anderer Wissenschaftler haben betreffend der globalen Abnahme der Ejakulatqualität des Menschen und des Tieres in den letzten Jahrzehnten keine Unterschiede aufgezeigt [89, 151].

In der aktuellen Diskussion werden endokrine Wirkungen von Phytoöstrogenen und Xenobiotika (östrogen bzw. androgenartige Wirkungen) auf die Gametenreifung heftig diskutiert und beforscht. Relativ unberücksichtigt bleiben jedoch direkte Effekte dieser oder anderer Substanzen auf die Integrität der Spermatozoenfunktion. Steroidartige Substanzen, die im Seminalplasma oder in anderen Körperflüssigkeiten (z.B. im Vaginalsekret) nachgewiesen wurden, können die regelrechte Funktion von Spermatozoen beeinträchtigen.

Genistein gehört zur Gruppe der Phytoöstrogene. Es ist im Serum von Menschen und Tieren nachgewiesen worden [140, 160] und wird über die Nahrung aufgenommen.

Phytoöstrogene sind Substanzen pflanzlicher Herkunft, deren Struktur die von endogenen Östrogene in Menschen und Tieren ähnelt. Diese Substanzen kommen ubiquitär in Pflanzen vor; relativ hohe Konzentrationen finden sich z.B. in Hopfen oder in Futtermitteln wie Sojabohnen, Favabohnen, Kleesorten, Lupinen oder Luzernen [81, 92]. Innerhalb der Nahrungskette bleiben Phytoöstrogene nachweisbar. So werden sie beispielsweise in Kuhmilch und in menschlichem Urin nachgewiesen [22].

Die Wirkung von Phytoöstrogenen ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. Hemmende Effekte auf die Zellproliferation durch Phytoöstrogene sind im Rattenmodell bzw. bei menschlichen Zellkulturen beschrieben worden [2, 103, 136]. Andererseits ist seit längerem der negative Einfluss auf die Fruchtbarkeit durch Phytoöstrogene in mehreren Tierspezies bekannt [81, 156].

Östrogenartige Stoffe aus der Industrie wie DDT und PCB wurden als mögliche Ursa-

che der abnehmenden Spermienzahl und anderen Fertilitätsprobleme in Menschen vorgeschlagen. Im Gegensatz zu den industriellen Xenoöstrogenen, die sich in Fettgewebe speichern und im Körper für viele Jahre verbleiben, werden Phytoöstrogene sehr schnell umgewandelt und finden sich nur kurzzeitig im Körper. Dennoch können Phytoöstrogene während dieser kurzen Zeit wesentliche Effekte im Körper auslösen. Die Wirkung der Phytoöstrogene auf einen Organismus ist abhängig von der Dauer und Wiederholung des Kontakts zwischen Organismus und Phytoöstrogenen sowie von der Konzentration der Phytoöstrogene im Körper.

Mit Genistein als Testsubstanz soll in dieser Arbeit überprüft werden, ob diese Substanz direkten Einfluss auf die funktionelle Integrität der bovinen Samenzelle hat und welche molekularen Signaltransduktionsmechanismen, die an der regelrechten Steuerung der Spermienfunktionen beteiligt sind, von Genistein beeinflusst werden. Vorbedingung für die Überprüfung der molekularen und funktionellen Effekte von Umweltsubstanzen, die einen negativen Einfluss auf Spermatozoenfunktion haben, ist die Etablierung eines zuverlässigen *in vitro* Testsystems mit Spermatozoen als Testzellen.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Doktorarbeit war es:

1. Ein valides und reproduzierbares *in vitro* Testsystem für essentielle Spermatozoenfunktionen zu etablieren. Um die Voraussetzungen zur Lösung der Fragestellungen zu schaffen, sollten verschiedene Testsysteme eingesetzt und überprüft werden.
2. Mit Genistein als Testsubstanz sollte der Einfluss von Phytoöstrogenen auf die Motilität, die Akrosomreaktion und die Kapazitation boviner Spermatozoen untersucht werden. Dabei waren folgende Fragestellungen zu klären:
 - Wie beeinflusst Genistein die Motilität boviner Spermatozoen?
 - Hat Genistein einen Einfluss auf den akrosomalen Status bzw. die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion?
 - Hat Genistein einen Einfluss auf die mit der Kapazitation assoziierten Veränderungen in der Proteintyrosinphosphorylierung?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

In seiner Grundstruktur besteht ein Säugerspermatozoon aus einem Kopf und einem Flagellum. Das Flagellum wird weiterhin in vier Regionen eingeteilt. Das Verbindungsstück (connecting piece) verbindet den Kopf mit dem Mittelstück des Schwanzes (midpiece). An das Mittelstück schliesst sich der Hauptteil des Schwanzes (principal piece) an, der in das Endstück (end piece) übergeht.

Die Beweglichkeit der männlichen Gameten ist eine essentielle Voraussetzung für die physiologische Befruchtung einer Eizelle. Der Spermatozoenschwanz enthält die für den Energiestoffwechsel und die Bewegung zuständigen Strukturen. Am Verbindungsstück inserieren die Mikrotubuli sowie die Mantelfasern (Outer Dense Fibers, ODF), die sich durch das Mittelstück und den Hauptteil des Schwanzes bis zum Endstück ziehen. Die für den Energiestoffwechsel des Spermatozoons verantwortlichen Mitochondrien liegen helikal gewunden im Mittelstück des Flagellums. Ihnen kommt die Aufgabe zu, Energie in Form von ATP zu erzeugen, die für die Bewegung der Mikrotubuli benötigt wird. Das Axonem wird im Hauptstück von einer filamentösen Struktur umgeben, die als fibröse Hülle bezeichnet wird [63, 132]. Beim Rind besitzt das Flagellum eine Länge von ca. $63\mu\text{m}$.

Der Spermatozookopf besitzt bei Säugern unterschiedliche Form und Größe. Bovinen Spermatozoen weisen einen flachovalen Kopf ($1\mu\text{m}$) von $8\mu\text{m}$ Länge und $4,5\mu\text{m}$ Breite [149]. Abbildung 2.1 zeigt eine schematische Darstellung eines bovinen Spermatozookopfes. Der Kopf der Säugerspermatozoen enthält den Zellkern, dessen porenlose Membran einen haploiden Chromosomensatz umschliesst. Im vorderen Kopfbereich befindet sich das Akrosom, das auch als ein Exozytosevesikel bezeichnet werden kann. Es hat eine der Zellkernmembran zugewandte innere und eine der Plasmamembran zugewandte

äußere akrosomale Membran (Abbildung 2.1). Das Lumen des Akrosoms enthält eine Vielzahl verschiedener proteolytischer Enzyme, die bei der Akrosomreaktion freigesetzt werden und es dem Spermatozoon ermöglichen die Zona pellucida zu durchdringen [196].

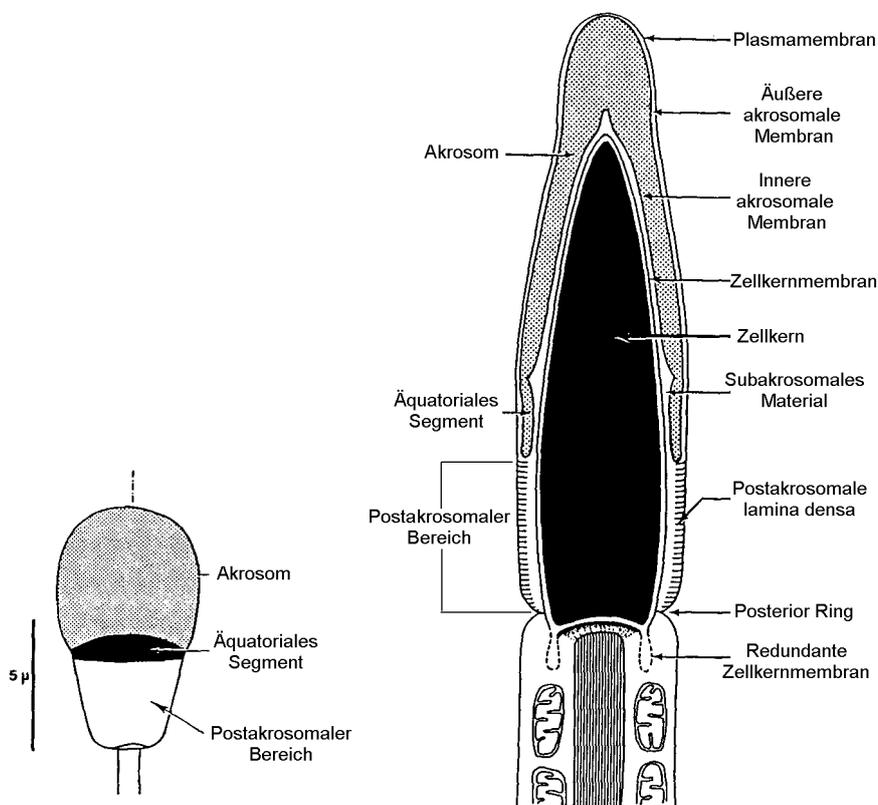


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines bovinen Spermatozoenkopfes. Frontalansicht (links) und Sagittalschnitt (rechts). Modifiziert nach Yanagimachi, 1994 [196]

2.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

2.2.1 Ejakulate

Die bovinen Spermatozoen, die auch für die Kryokonservierung weiter verarbeitet wurden, stammten von 14 bis 16 Monate alten Besamungsbullen der Zucht- und Besamungsunion Hessen eG. Andere Ejakulate wurden von Bullen der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

In beiden Fällen erfolgte das Absamen der Bullen mittels einer künstlichen Vagina. Die

Ejakulate wurden innerhalb einer Stunde verarbeitet. Sie wurden bezüglich der Spermatozoendichte, -morphologie und -motilität untersucht. Es wurden nur Spermatozoen für die weiteren Untersuchungen verwendet, deren Parameter (Konzentration, Morphologie, Motilität) sich im Normbereich [148] befanden.

2.2.2 Kryokonservierung

FrISCHE, bovine Ejakulate wurden zunächst für 5-10min in einem Wasserbad bei 34°C inkubiert und anschließend in zwei Portionen aufgeteilt. Die Kryokonservierung erfolgte zum einen unter Zugabe von AndroMed® [3], einem Kryoprotektivum, das unter anderem Soja-Lecithin enthält, zum anderen in einem Tris-Eigelb-Kryoprotektivum (Tabelle 2.1). Die Ejakulate wurden unter leichtem Schütteln mit dem jeweiligen Kryoprotektivum auf eine Endkonzentration von 100×10^6 Spermatozoen/ml verdünnt und in Portionen von je 200 µl in Cassou® Ministraws (Einfrierröhrchen) abgefüllt. Die Portionsröhrchen wurden dann von RT auf 5°C im Kühlschrank für 2h abgekühlt. Abschließend wurden sie mittels flüssigem Stickstoff in einem Gefrierautomaten mit einer Geschwindigkeit von 60°C/min auf -180°C gekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Proben wurden die Ministraws in 39°C warmem Wasser für 30s leicht geschwenkt.

Tabelle 2.1: Tris-Eigelb-Kryoprotektivum für Spermatozoen

Substanz	Konzentration
Glycerin (Merck)	6% v/v
Eigelb	20% v/v
Fruktose (Merck)	55,5mM
Citronensäure (Merck)	62mM
Tris (Roth)	198mM
Penicillin G-Na (Sigma)	500 IE/ml
Lincomycin (Sigma)	150 µg/ml
Spectinomycin (Sigma)	300 µg/ml

pH-Wert: 6,7

2.3 Aufbereitung der Spermatozoen durch das Swim-up-Verfahren

Das Swim-up-Verfahren ist eine Arbeitsmethode zur Anreicherung von motilen Spermatozoen, die vor allem im Rahmen künstlicher Befruchtung angewandt wird. Es dient dazu, Spermatozoen vom Seminalplasma zu trennen und eine höhere Konzentration motiler und morphologisch intakter Spermatozoen zu erhalten [143, 190].

Bei diesem Verfahren werden die Ejakulate zunächst nach Zugabe von Medium durch Zentrifugation gewaschen. Das Sediment mit den Spermatozoen wird mit Medium überschichtet und bei der Temperatur inkubiert, die der Körperkerntemperatur des Menschen (37°C) bzw. der jeweiligen Tierart (z.B. 38°C) entspricht.

Dieses Verfahren ermöglicht den motilen Spermatozoen, sich aktiv aus dem Sediment in das überschichtete Medium zu bewegen. Die im Überstand befindlichen, aus dem Sediment aufgeschwommenen, beweglichen Spermatozoen werden abpipettiert und für die Untersuchungen verwendet.

Die Proben (Inhalt von jeweils 2 aufgetaute Straws bzw. 300µl frisch gewonnener Spermatozoen) wurden in Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson Labware) überführt und bei RT 2 x 5min mit jeweils 2ml 38,5°C warmem HAM F10 Medium + 0,3% BSA (Fraktion V) bei 300xg zentrifugiert (Tabelle 2.2). Der Überstand wurde verworfen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zentrifugenröhrchen schräg auf einen Ständer gestellt (45° Winkel). Das Sediment wurde vorsichtig mit 500µl-700µl HAM F10 + 0,3% BSA überschichtet und für 45min bei 38,5°C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank (Heraeus) inkubiert. Die Überstände mit den motilen Spermatozoen wurden abpipettiert und vereinigt. Die Spermatozoen-Konzentration wurde auf eine Zellzahl von 20 bis 30x10⁶/ml eingestellt.

Bei allen durchgeführten Untersuchungen wurden sowohl die Testspermatozoen als auch die Kontrollpermatozoen aus der selben Spermatozoensuspension gewonnen.

Tabelle 2.2: HAM F10 Medium

Substanz	Konzentration
Nutrient Mixture F10 HAM (Sigma)	100ml
200mM L-Glutamin-Lösung (Sigma)	0,5ml
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Sigma)	1ml
BSA Fraktion V (Sigma)	0,3%

pH-Wert: 7,4

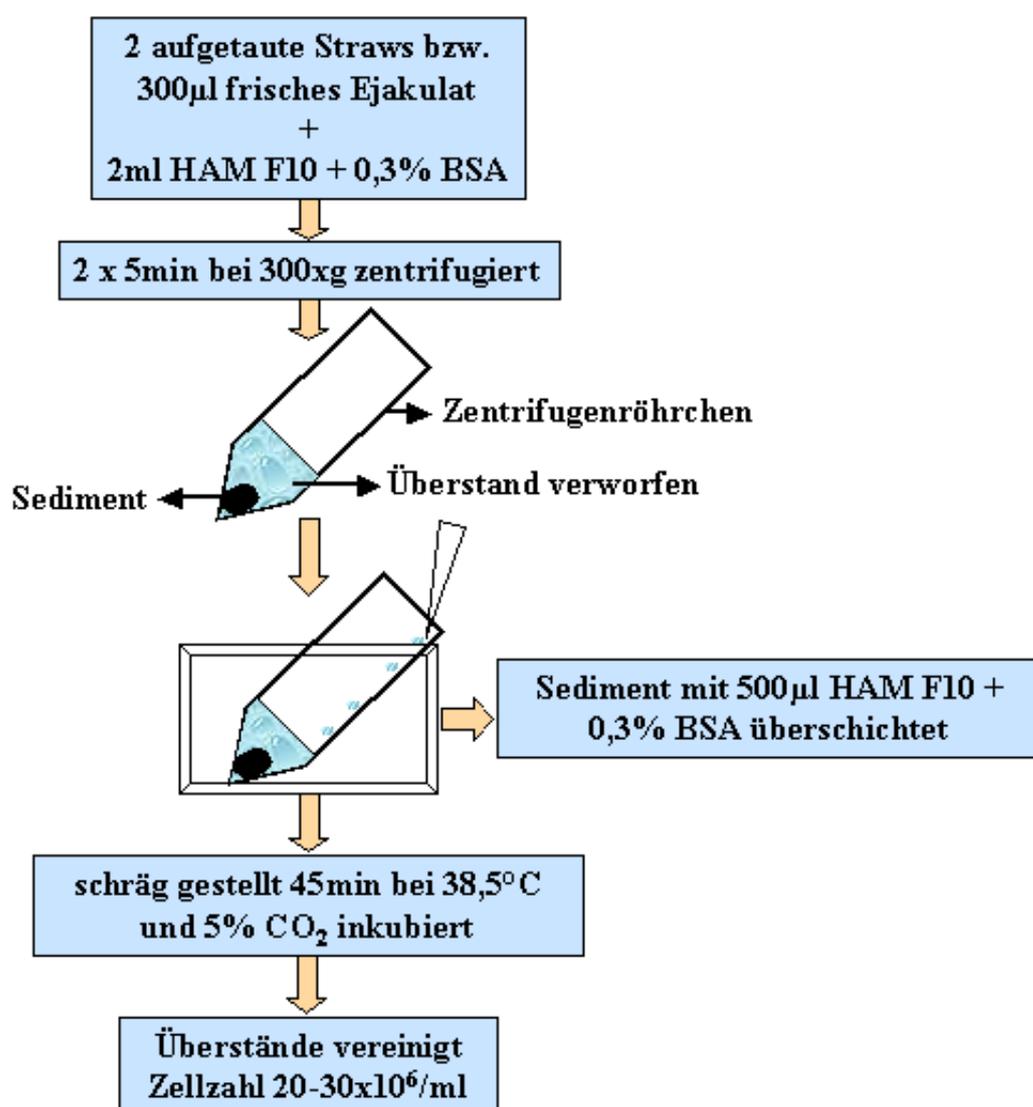


Abbildung 2.2: Swim-up-Verfahren

2.4 Aufbereitung der Spermatozoen durch Glaswollsäule-Filtration

Die Glaswollsäule-Filtration wird neben dem Swim-up als Methode zur Anreicherung von motilen Spermatozoen im Rahmen der künstlichen Befruchtung angewandt. In menschlichen Ejakulaten wurde nachgewiesen, dass mit der Verwendung einer Glaswollsäule bei der Spermatozoen-Aufbereitung eine erhöhte Anzahl motiler Samenzellen und die Entfernung von 70 bis 80% der Leukozyten aus dem Ejakulat und somit eine erniedrigte Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies erzielt werden kann [155]. Darüber hinaus zeigen die mit einer Glaswollsäule filtrierte Spermatozoen eine bessere Chromatinkondensation, welche positiv mit den Fertilisierungsraten der Spermatozoen korreliert wird. Motile und immotile Spermatozoen werden durch das im folgenden beschriebene Zusammenspiel des Filtrationseffektes der Glaswolle und der Eigenbeweglichkeit der Spermatozoen getrennt: Nur motile Spermatozoen können die Faserzwischenräume durchschwimmen und erreichen das Filtrat. Immotile Spermatozoen sowie Erythrozyten, Leukozyten aber auch Debris werden vom Fasermaterial zurückgehalten. Die Abbildung 2.3 zeigt eine schematische Darstellung einer Glaswollsäule.

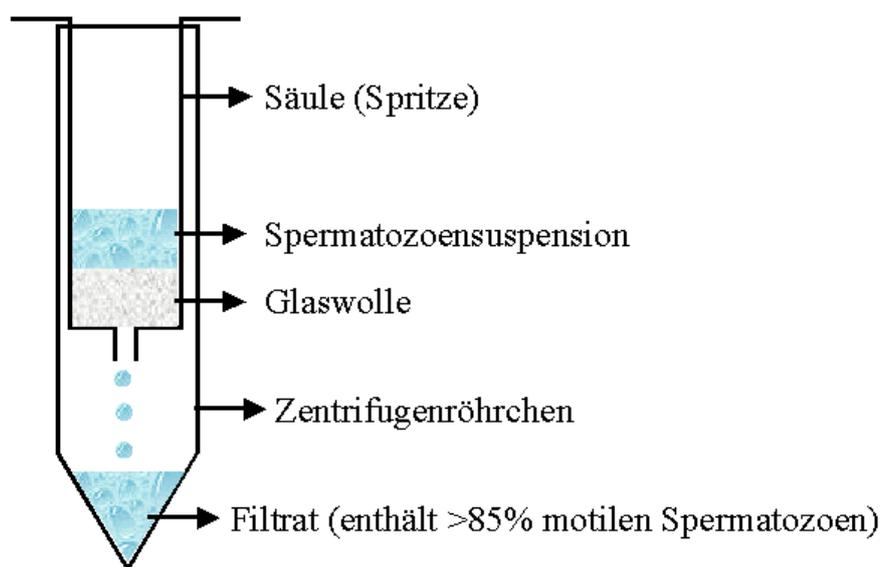


Abbildung 2.3: Glaswollsäule-Filtration

Die Glaswollsäule (SpermFertil[®], Mello Ltd.) wurde mit 3-4ml 38,5°C warmem HAM F10 + 0,3% BSA gewaschen. Das Filtrat wurde verworfen. Die Probe (2-3 aufgetaute Straws) wurde mit 2ml warmem HAM F10 + 0,3% BSA überschichtet und auf die Säule aufgetragen. Die Filtration erfolgte unter zeitweiliger Sichtkontrolle bei 38,5°C. Die Säule wurde dann mit 300-400 μ l HAM F10 + 0,3% BSA gewaschen, und das Filtrat wurde 5min bei 900xg zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend im HAM F10 + 0,3% BSA (Spermatozoendichte = 20-30x10⁶/ml) resuspendiert und 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank inkubiert.

2.5 Funktionelle Untersuchungen

2.5.1 Motilitätsmessung

Alle Analysen der Motilitätsparameter wurden mit dem speziell für die Spermatozoenuntersuchung entwickelten CASA-System (*computer assisted semen analysis*) der Fa. Medical Technologies Montreux SA vorgenommen. CASA-Systeme dienen allgemein der objektiven Erfassung von Motilitätsparametern. Das CASA-System besteht aus einem Mikroskop (Nikon Optiphot-2-Mikroskop) mit einem Phasenkontrastobjektiv (Vergrößerung x 20), an welches eine Videokamera (Kappa CF 8/1) angeschlossen ist. Ein Computer mit einem Intel[®] Pentium III Prozessor dient zur Aufnahme der Videosequenzen und der Datenanalyse. Des Weiteren ermöglicht ein Bildschirm die Kontrolle über das Blickfeld und die Tiefenschärfe. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm Cell Motion Analyser V2.0.

Das Programm unterscheidet Spermatozoen von nicht-Spermatozoen und Artefakte (z.B. Spermatogenezellen, Leukozyten oder andere Schmutzpartikel), indem es zunächst die beweglichen Objekte als Spermatozoen annimmt und dessen mittlere Kopfgröße ermittelt. Diese Kopfgröße vergleicht das Programm dann mit der Größe und der Form unbeweglicher Objekte. Dabei wird auch im Umfeld des Kopfes nach einem Flagellum gesucht. Das Computerprogramm ist durch die Detektion eines Schwanzes in der Lage, immotile Spermatozoen (mit Schwanz) von Artefakten zu unterscheiden.

Um die Motilität der zu untersuchenden Spermatozoen zu beurteilen, wurden verschiedene Motilitätsparameter nach Burkman (1990) [34] definiert. Die Bahn, auf der sich ein Spermatozoon bewegt, wird als „*curved line*“ bezeichnet. Die Geschwindigkeit auf dieser

Bahn heißt Kurvenliniengeschwindigkeit (*Velocity of Curved Line*, VCL) und berechnet sich aus der zurückgelegten Strecke pro Zeit in $\mu\text{m/s}$.

Die Geschwindigkeit über die geglättete Bewegungsbahn des Spermatozoons wird als *Velocity of Average Path* (VAP) bezeichnet und gibt die tatsächlich im Zeitraum der Messung zurückgelegte Wegstrecke an.

Die Geschwindigkeit vom Anfangspunkt zum Endpunkt der zurückgelegten Strecke während der Messung wird als *Velocity of Straight Line* (VSL) bezeichnet.

Bei der Bewegung ist auch der Spermatozookopf einer seitlichen Auslenkung ausgesetzt. Die Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung (*amplitude of lateral head displacement*, ALH) bestimmt sich aus der maximalen Abweichung des Kopfes von der Mittellinie und wird in μm angegeben.

Die genannten Motilitätsparameter sind in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt.

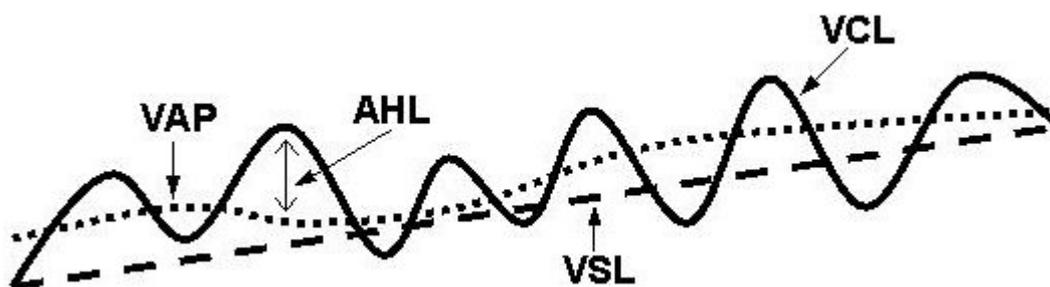


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Strecken, die zur Berechnung der Geschwindigkeit des Spermatozookopfes verwendet werden. VCL = Kurvenliniengeschwindigkeit; VAP = Geschwindigkeit auf der mittleren räumlichen Bewegungsbahn; VSL = Geschwindigkeit auf der Strecke zwischen Anfang und Ende einer Messung; ALH = maximale seitliche Kopfauslenkung von der durchschnittlichen Wegstrecke.

Die Spermatozoen werden nach ihren Motilitätsmustern in folgende Kategorien eingeteilt: a) immotile Spermatozoen, b) lokalmotile Spermatozoen und c) progressivmotile Spermatozoen. Progressive Motilität wird noch einmal in Hyperaktivität, lineare Motilität, und nicht-lineare Motilität untergliedert (Abbildung 2.4 und Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Definierte Motilitätsparameter im CASA-System

Motilitätsmuster	VAP	VCL	ALH	Linearität (VSL/VCL x 100)
immotil	$<5\mu\text{m/s}$			
lokalmotil	$\geq 5\mu\text{m/s}$ u. $<20\mu\text{m/s}$			
progressivmotil	$\geq 20\mu\text{m/s}$			
hyperaktiv	$\geq 20\mu\text{m/s}$	$\geq 100\mu\text{m/s}$	65%	$\geq 7,5$
linermotil	$\geq 20\mu\text{m/s}$		$\geq 90\%$	
nicht-linearmotil	$\geq 20\mu\text{m/s}$		$<90\%$	

Modifiziert nach Burkmann 1990 und Mortimer 1997 [34, 127]. VAP = Geschwindigkeit auf der mittleren räumlichen Bewegungsbahn; VCL = Kurven-Liniengeschwindigkeit; VSL = Geschwindigkeit auf der Strecke zwischen Anfang und Endpunkt einer Messung; ALH = maximale seitliche Kopfauslenkung von der durchschnittlichen Wegstrecke.

Für einen Messvorgang wurden $5\mu\text{l}$ der Spermatozoen-Suspension in die auf $38,5^\circ\text{C}$ vorgewärmte Maklerkammer[®] (Sefi Medical) gegeben und aus vier verschiedenen Arealen mindestens 200 Spermatozoen statistisch erfasst. Der Objektisch hatte eine Temperatur von $38,5^\circ\text{C}$ für bovine Spermatozoen.

Die während eines Messvorgangs ermittelten Daten wurden in einem Spermogramm zusammengefasst und ausgedruckt.

2.5.2 Vitalitätsuntersuchung und Evaluierung des akrosomalen Status

Mit dieser Methode können von bovinen Spermatozoen sowohl der akrosomale Status als auch die Vitalität ermittelt werden [45, 46].

Die Vitalitätsbestimmung bei bovinen Spermatozoen erfolgte durch den Fluoreszenzfarbstoff bis-Benzimide 33258 (Hoechst 33258; Sigma). Der Farbstoff permeiert durch die Membranen toter Spermatozoen und dringt in den Zellkern ein. Dort bindet er irreversibel an die im Spermatozoenkopf befindliche DNA. Während lebende Spermatozoen durch den Farbstoff nicht oder nur schwach im Bereich des Schwanzansatzes markiert werden, können tote Spermatozoen durch eine leuchtend blaue Fluoreszenzfärbung im Kopfbereich von lebenden Zellen unterschieden werden [80, 86].

$100\mu\text{l}$ von der Spermatozoensuspension wurden mit einer Endkonzentration von $1\mu\text{g/ml}$

Hoechst 33258 (H258) 10min lang bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, wurden die Spermatozoen 2 x 5min bei 700xg mit auf 38,5°C vorgewärmtem PBS (Biochrom)/2% PVP (Sigma) gewaschen und sedimentiert. Die anschließend in 20µl PBS resuspendierten Spermatozoen wurden auf zwei Objektträgern (Menzel-Gläser) ausgestrichen und bei RT unter Lichtausschluss getrocknet. Die getrocknete Spermatozoenausstriche wurden 30s lang mit 100%igem Methanol (Riedel-de Haën) fixiert, dann 2 x 5min in Aqua dest. gewaschen und wiederum bei RT getrocknet.

Um den akrosomalen Status der Spermatozoen zu untersuchen, wurde die PSA-FITC-Färbung durchgeführt. *Pisum sativum* Agglutinin (PSA) ist ein Lektin der Erbse und hat die Eigenschaft, sich an bestimmte Glykoproteine zu binden. Bei fixierten und membranpermeabilisierten Spermatozoen mit intaktem Akrosom bindet PSA im Bereich der Kopfkappe an Glykoproteine der inneren akrosomalen Membran und an die akrosomale Matrix. Aufgrund der Konjugation von PSA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeiniso-thiocyanat (FITC) können Glykoproteine im Fluoreszenzmikroskop durch eine grün-gelbe Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht werden. Spermatozoen, die akrosomreagiert sind, zeigen am Kopf nur im Bereich des äquatorialen Bandes eine Fluoreszenzfärbung oder erscheinen vollständig dunkel. Dagegen kann ein Spermatozoon mit intaktem Akrosom durch eine intensiv grün-gelbe Färbung an der vorderen Hälfte des Spermatozoenkopfes identifiziert werden [45, 46].

Zur Detektion akrosomreagierter und akrosomintakter Spermatozoen wurde PSA-FITC (Sigma) in PBS gelöst (600µg/ml) und in Portionen zu je 100µl bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde der Farbstoff mit PBS auf eine Endkonzentration von 30µg/ml verdünnt. Die Spermatozoenausstriche wurden dann in einer feuchten Kammer bei RT 30min lang mit der PSA-FITC-Lösung überschichtet und unter Lichtausschluss gehalten. Nach zwei Waschkvorgängen in Aqua dest. von je 5min wurden die noch feuchten Spermatozoenausstriche mit dem Spezialmedium Citifluor[®] (Plano) beschichtet, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verlangsamen. Danach wurden die Spermatozoen mit einem Deckglas (Menzel-Gläser) abgedeckt und bis zur Auswertung im Dunkeln bei RT aufbewahrt.

Zum Abschluss wurden die mit PSA-FITC und H258 gefärbten Spermatozoen mit einem Mikroskop (Axioskop; Zeiss), das mit einer Fluoreszenzeinrichtung und den entsprechenden Filtern (Zeiss) ausgestattet war, untersucht (Anregung für H258: 365nm

und PSA-FITC: 450-490nm). Durch Wechseln der Filter konnten in einem Blickfeld an ein und demselben Spermatozoon beide Färbungen beurteilt und dokumentiert werden. Es wurden jeweils 200 Spermatozoen aus verschiedenen Bereichen des Objektträgers ausgewertet und nach ihren Färbungsmustern in folgende Kategorien eingeteilt: a) akrosomintakt lebend (AIL): PSA-FITC positiv, H258 negativ, b) akrosomreagiert lebend (ARL): PSA-FITC negativ, H258 positiv, c) akrosomintakt tot (AIT): PSA-FITC positiv, H258 positiv und d) akrosomreagiert tot (ART): PSA-FITC negativ, H258 positiv (Abbildung 2.5). Die Auswertung erfolgte „einfach-blind“ und wurde regelmäßig durch einen zweiten Experimentator validiert.

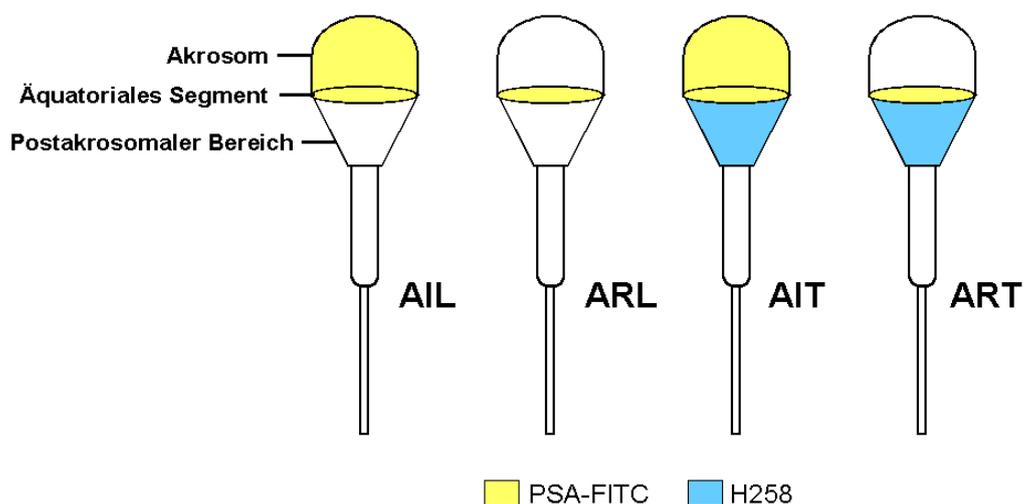


Abbildung 2.5: PSA-FITC/H258-Doppelfärbung für die Auswertung des akrosomalen Status und der Vitalität in Spermatozoen. **AIL:** akrosomintakt lebend, **ARL:** akrosomreagiert lebend, **AIT:** akrosomintakt tot und **ART:** akrosomreagiert tot.

2.5.3 Untersuchung des akrosomalen Status und Induzierbarkeit der Akrosomreaktion

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion wurden zwei Substanzen verwendet, die physiologisch die Akrosomreaktion induzieren können: Progesteron und ZP3.

Progesteron ist ein Hormon, das u.a. in der Follikelflüssigkeit vorkommt und die Akrosomreaktion in Spermatozoen verschiedener Spezies induziert [121, 147].

Für die Progesteron Vorratslösung wurden 3,145mg Progesteron (Aldrich-Chemie) abgewogen und in 2ml DMSO (Fluka) gelöst. Die entstandene 5mM Lösung wurde zu je 20 μ l aufgeteilt und bei -20°C eingefroren. Pro Versuch wurde eine Charge aufgetaut und 1:100 mit HAM F10 + 0,3% BSA verdünnt.

Bei dem ZP3-6 Peptid handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Peptid, abgeleitet aus den bekannten cDNA Sequenzen der Zona pellucida Proteine. Verglichen mit der ermittelten Konsensusprimärstruktur, ergab sich für die dem ZP3-6 Peptid zugrunde liegende Primärstruktur eine Übereinstimmung von 100% mit dem entsprechenden rinderspezifischen ZP3 Sequenzabschnitt.

Das ZP3-6 Peptid wurde in einer Konzentration von 1mg/ml in Aqua dest. gelöst und in HAM F10 Medium auf eine Konzentration von 10 μ M verdünnt. Die so hergestellte Verdünnung wurde bei -20°C gelagert und für das jeweilige Experiment wieder aufgetaut.

Die Spermatozoen wurden je nach Fragestellung verarbeitet und insgesamt über 4h kapazitiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Spermatozoensuspension geteilt in: a) Kontrolle (Zugabe von DMSO bzw. Medium in entsprechender Konzentration und Volumen wie bei der Testprobe), b) Progesteron (Zugabe von 1 μ M fc Progesteron) und c) ZP3-6 Peptid (Zugabe von 1 μ M fc ZP3-6 Peptid).

Die Proben wurden bei 38,5°C 15min lang mit den Induktoren inkubiert. Anschließend wurde der H258 Farbstoff (1 μ g/ml fc) hinzupipettiert. Nach weiteren 10min Inkubation bei 38,5°C wurden die Proben 2 x 5min bei 700xg in jeweils 1ml PBS/2%PVP zentrifugiert.

Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand bis auf 20 μ l über dem Sediment abgezogen. Nach vorsichtigem Resuspendieren des Sediments in 20 μ l PBS/2%PVP wurden die Spermatozoen auf den vorbereiteten Objektträgern ausgestrichen und wie bereits beschrieben für die Auswertung des akrosomalen Status gefärbt.

2.6 Einfluss von Genistein auf Motilität, Vitalität und Induzierbarkeit der Akrosomreaktion boviner Spermatozoen

Für diese Experimente wurden sowohl kryokonservierte Spermatozoen als auch frisch gewonnene Ejakulate verwendet. Die Spermatozoen wurden wie zuvor beschrieben im Swim-up-Verfahren aufbereitet.

Genistein (Stocklösung $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in DMSO; Sigma) wurde mit HAM F10 + 0,3% BSA vorverdünnt und in einem Eppendorfgefäß (Sarstedt) mit der Spermatozoensuspension ($20\text{-}30 \times 10^6$ Spermatozoen/ml) auf eine Endkonzentration von $2\mu\text{g}/\text{ml}$ vermischt. Als Kontrolle diente DMSO in einer Endkonzentration von $0,2\mu\text{l}/\text{ml}$ (DMSO wurde in HAM F10 + 0,3% BSA vorverdünnt). Bei den frisch gewonnenen Spermatozoen wurde die Motilität direkt nach Zugabe von Genistein oder DMSO und nach 2h Inkubation gemessen. Bei den kryokonservierten Spermatozoen erfolgte die Motilitätsmessung direkt nach Beendigung des Swim-up-Verfahrens und 2h nach Inkubation mit Genistein oder DMSO.

Zur Untersuchung der Vitalität wurden Aliquots der Proben direkt nach Zugabe von Genistein oder DMSO entnommen und wie bereits beschrieben weiter verarbeitet.

Die Proben wurden 2,5h bei $38,5^\circ\text{C}$ mit 5% CO_2 im Begasungsbrutschrank inkubiert und anschließend über 5min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment wurde in dem selben Volumen HAM F10 + 0,3% BSA resuspendiert und 10min im Brutschrank inkubiert. Nach der Messung der Motilität wurden die Proben zur Untersuchung der Vitalität und des akrosomalen Status weiter verarbeitet. Die gesamte Inkubationszeit betrug 4h.

Abbildungen 2.6 und 2.7 verdeutlichen den Ablauf des Versuchs.

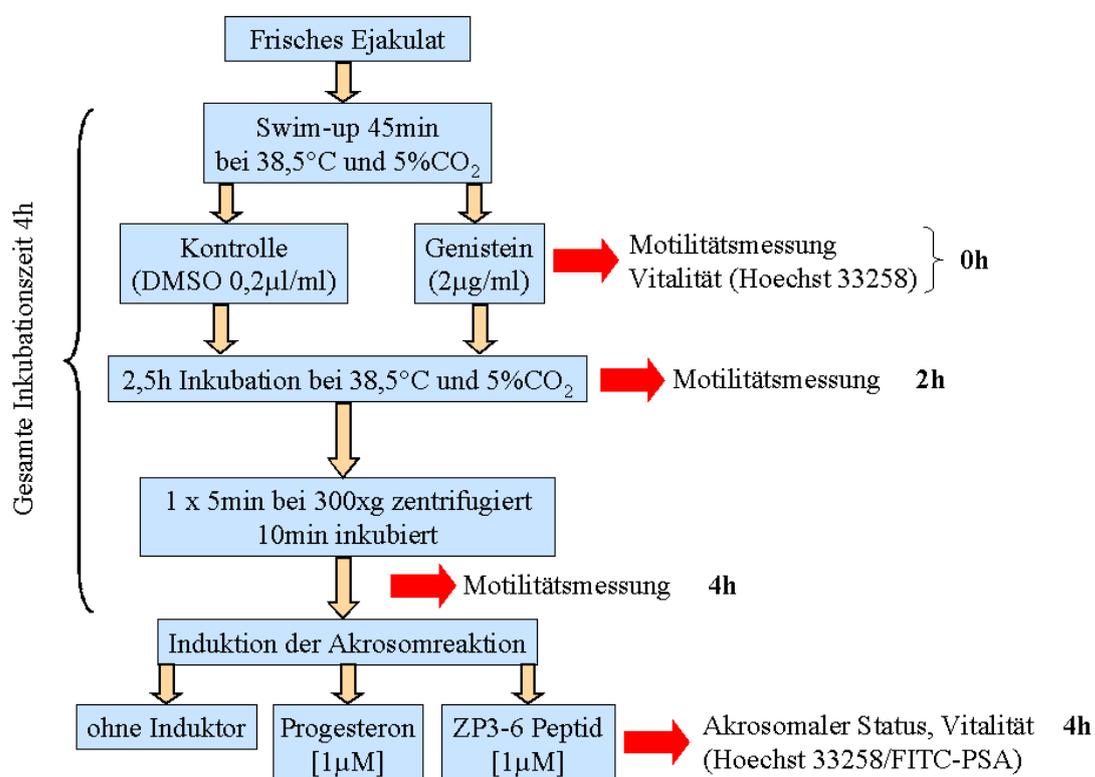


Abbildung 2.6: Ablauf der Messung der Induktion der Akrosomreaktion in Spermatozoen aus frischem Ejakulat.

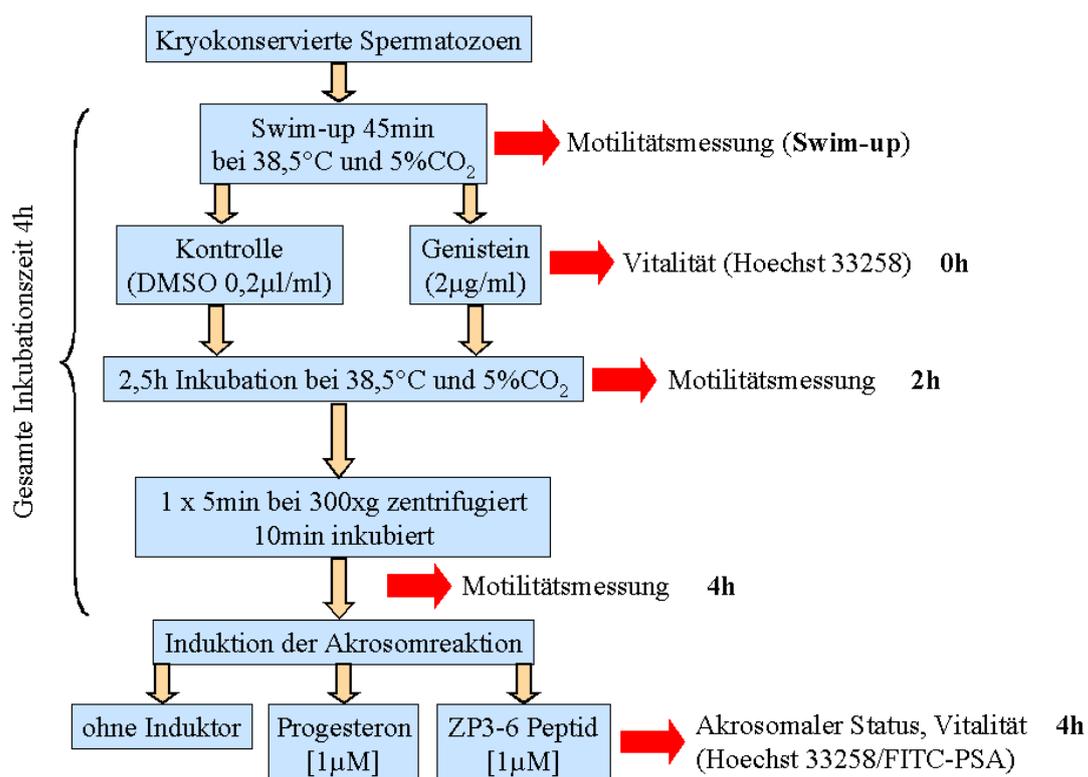


Abbildung 2.7: Ablauf der Messung der Induktion der Akrosomreaktion in kryokonservierten Spermatozoen.

2.7 Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Die SDS-PAGE ist eine gängige Methode zur Auftrennung von Proteingemischen. Dabei werden die Proteine durch Natrium-Dodecylsulfat (SDS) denaturiert und mit negativen Ladungen bestückt. Die Proteine werden im Polyacrylamidgel nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt [102]. Im anschließenden Western Blot werden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert [169] und die gesuchten Proteinkomponenten mit einem Antikörper nachgewiesen (Immunoblot).

Die durchgeführten Western Blots dienen dazu, die Protein-Tyrosinphosphorylierung in Proteinextrakten boviner Spermatozoen zu untersuchen.

2.7.1 Aufbereitung der Spermatozoen zur Proteinextraktion

Die Spermatozoen (frisch oder kryokonserviert) wurden unter verschiedenen Bedingungen inkubiert, um den Einfluss von Kapazitationsmedium (HAM F10 bzw. TALP-Medium; siehe Tabelle 2.2 und 2.4) und Genistein auf die Protein-Tyrosinphosphorylierung zu untersuchen.

Frisches Ejakulat:

Frisch gewonnenes Ejakulat wurde mit 8ml Kapazitationsmedium pro 2ml Ejakulat versetzt und für 10min bei 300xg zentrifugiert, um das Seminalplasma zu entfernen. Das resultierende Sediment wurde mit Kapazitationsmedium resuspendiert und dieser Waschschritt wiederholt. Das Sediment wurde erneut mit 6-7 ml Kapazitationsmedium resuspendiert und die Anzahl der gewonnenen Spermatozoen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kalensee) bestimmt. Es wurde eine Endkonzentration von 50×10^6 Spermatozoen/ml durch Verdünnung mit Kapazitationsmedium eingestellt.

Tabelle 2.4: TALP-Medien zur Kapazitation boviner Spermatozoen

Substanz	TALP	TALP-H
NaCl (Roth)	100mM	100mM
KCl (Merck)	3,1mM	3,1mM
NaH ₂ PO ₄ (Merck)	0,3mM	0,3mM
Na-Laktat (Sigma)	21,6mM	21,6mM
MgCl ₂ · 6 H ₂ O (Merck)	0,4mM	0,4mM
EDTA (Merck)	0,4mM	0,4mM
HEPES (Sigma)	10mM	40mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (Merck)	2mM	2mM
NaHCO ₃ (Serva Feinbiochemica)	25mM	10mM
Na-Pyruvat (Sigma)	1mM	1mM
BSA Fraktion V (Sigma)	6mg/ml	-
Polyvinylalkohol (Sigma)	-	1mg/ml
Gentamycin (GibcoBRL)	-	50µg/ml
	pH-Wert: 7,4	

Kryokonservierte Spermatozoen:

Die Straws (Anzahl je nach Fragestellung) mit den kryokonservierten Spermatozoen wurden wie zuvor beschrieben aufgetaut. Der Inhalt von je 2 Straws wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und über 2 x 5min mit jeweils 2ml Kapazitationsmedium bei 300xg zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Sediment im Kapazitationsmedium auf eine Konzentration von 50x10⁶ Spermatozoen/ml eingestellt. Die Probe wurde je nach Fragestellung entsprechend weiter verarbeitet.

Einfluss von Genistein und Kapazitationsmedium auf die Tyrosinphosphorylierung

Die Proben (frisch gewonnenes Ejakulat bzw. kryokonservierte Spermatozoen) wurden mit zwei unterschiedlichen Kapazitationsmedien inkubiert.

Die Kapazitation der Spermatozoen erfolgte zum einen nach dem von Galantino-Homer *et al.*, 1997 beschriebenen Protokoll [75]. Die Spermatozoen wurden nach diesem Pro-

tokoll in TALP-H-Medium gewaschen und in TALP-Medium (Tabelle 2.4) inkubiert. Das TALP-H-Medium enthält im Vergleich zum TALP-Medium eine niedrigere Konzentration von Bikarbonat und kein BSA. Der Einsatz dieses Mediums soll verhindern, dass der Kapazitationsprozess in den Spermatozoen schon beim Waschen der Zellen beginnt [75]. Zum anderen wurde HAM F10 + 0,3% BSA, ein weiteres in der Literatur beschriebenes Kapazitationsmedium, als Inkubationsmedium verwendet.

Die Spermatozoen wurden, wie zuvor beschrieben, gewaschen (mit TALP-H-Medium bzw. HAM F10 + 0,3% BSA) und in Kapazitationsmedium (TALP-Medium bzw. HAM F10 + 0,3% BSA) resuspendiert (Abbildung 2.8 und 2.9). Die Spermatozoensuspension wurde in 12 Portionen von 100 μ l je Eppendorfgefäß aufgeteilt und wie folgt behandelt (Abbildung 2.10):

- a) Zu den Portionen 1, 2 und 3 wurden Heparin (10 μ g/ml fc; Sigma), Dibutyryl-Cyclo-Adenosinmonophosphat(dbcAMP, 1mM fc; Sigma) und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX, 100mM fc; Aldrich-Chemie) hinzupipettiert. Diese Substanzen fördern die Kapazitation boviner Spermatozoen [75].
- b) Portionen 4, 5 und 6 wurden mit Genistein, Heparin, dbcAMP und IBMX behandelt.
- a) Portionen 7, 8 und 9 wurden nicht weiter behandelt.
- c) Portionen 10, 11 und 12 wurden mit Genistein in einer Konzentration von 2 μ g/ml inkubiert.

Die Proben wurden im Begasungsbrutschrank bei 38,5°C mit 5% CO₂ bis zu vier Stunden lang inkubiert, um die Kapazitation der Spermatozoen zu ermöglichen. Die Proteinextraktion erfolgte zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 4h nach dem folgenden Schema:

- 0h: Portionen 1, 4, 7 und 10
- 2h: Portionen 2, 5, 8 und 11
- 4h: Portionen 3, 6, 9 und 12

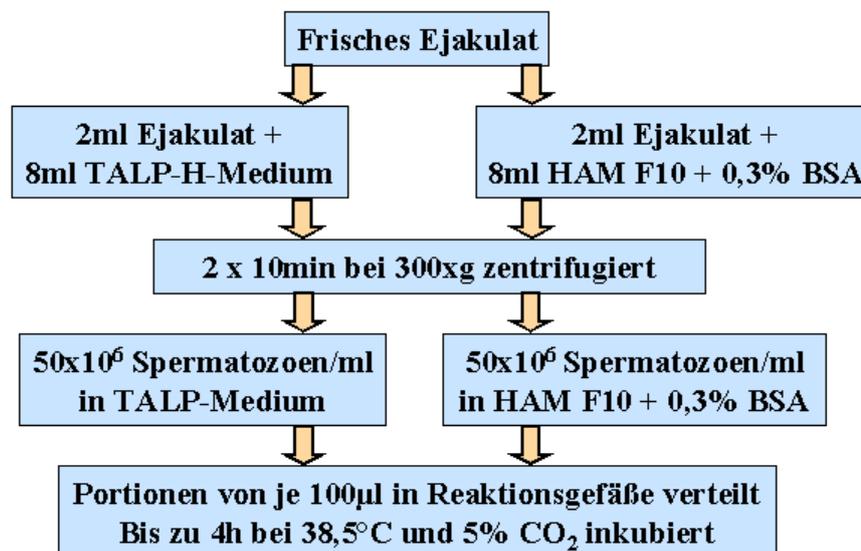


Abbildung 2.8: Vorbereitung frischer Ejakulate für die Proteinextraktion.

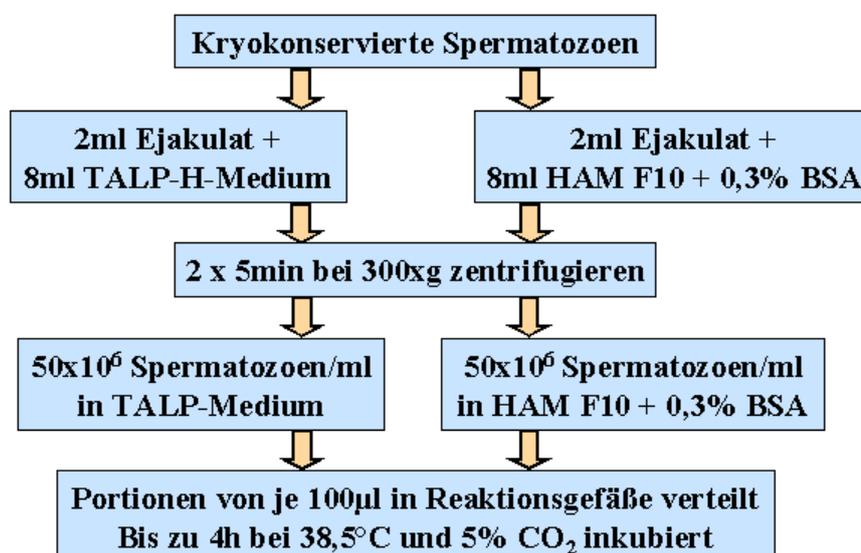


Abbildung 2.9: Vorbereitung kryokonservierter Spermatozoen für die Proteinextraktion.

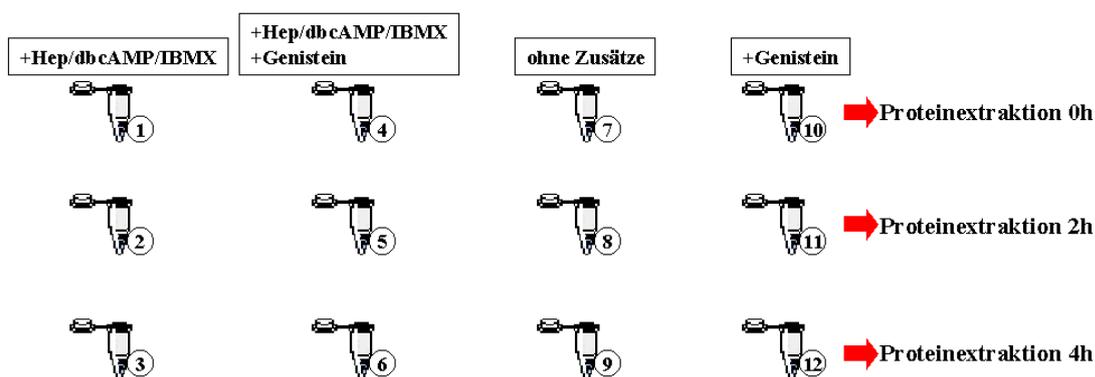


Abbildung 2.10: Portionierung der Spermatozoensuspension für die Proteinextraktion.

Proteinextraktion

Zur Auftrennung von Proteinen aus Spermatozoenextrakten in der SDS-PAGE wurden $100\mu\text{l}$ der Spermatozoensuspension (ca. 5×10^6 Zellen) für 3min bei $22.000 \times g$ bei RT zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1ml PBS unter Zusatz von Proteasehemmstoffen (siehe verwendete Lösungen 2.7.4) resuspendiert. Die Suspension wurde für 3min bei $22.000 \times g$ bei RT zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde in $30\mu\text{l}$ Extraktionspuffer nach Laemmli (1970) [102] aufgenommen, 5min bei 95°C erhitzt und bei RT 3min bei $22.000 \times g$ zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und in ein $0,5\text{ml}$ Eppendorfgefäß transferiert. Zu dem Überstand wurde β -Mercaptoethanol (Bio-Rad) in einer Endkonzentration von 10% hinzugefügt. Die Proben wurden 5min bei 95°C erhitzt und anschließend 1min bei $22.000 \times g$ zentrifugiert. Der Extraktionspuffer mit den gelösten Proteinen wurde bis zu seiner Verwendung für die Gelelektrophorese bei -20°C gelagert.

2.7.2 Durchführung der Gelelektrophorese und des Western Blots

Verwendet wurden $0,75\text{mm}$ dicke Gele mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 10% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel. In das Sammelgel wurde ein Gelkamm geschoben. Nach 30min wurde der Gelkamm aus dem polymerisierten Sammelgel wieder entfernt und das Gel in einer Elektrophoresekammer mit Laufpuffer überschichtet (siehe verwendete Lösungen 2.7.4).

Die im Extraktionspuffer gelösten Proteine wurden mit einer Hamilton-Spritze (Hamil-

ton Bonaduz AG) in die durch den Gelkamm entstandenen Geltaschen gefüllt (je Geltasche Proteinextrakte aus $1,5 \times 10^6$ lysierten Spermatozoen). Als Molekulargewichtsmarker dienten der „Kaleidoskop“ Proteinstandard und biotinylierte Standard Proteine (beide von der Firma Bio-Rad). Die Standards enthalten Proteine mit definiertem Molekulargewicht. Der Probenpuffer enthielt den Farbstoff Bromphenolblau (Sigma), um die Laufgeschwindigkeit der Proteine während der Elektrophorese zu kontrollieren.

Es wurden zwei Elektrophorese-Systeme verwendet:

1. Das Mini Protean II von Bio-Rad ermöglicht eine Trennung der Proteine in Mini-Gelen (8 x 9cm). Die Elektrophorese wurde bei RT mit einer konstanten Spannung von 200V über einen Zeitraum von ca. 45min durchgeführt.
2. Im Hoefer[®] Elektrophorese-System von Amersham wurden Gele mit einer Größe von 18 x 16cm verwendet. Die Elektrophorese wurde bei RT mit einer konstanten Stromstärke von 20mA für das Sammelgel und 30mA für das Trenngel über einen Zeitraum von ca. 3 Stunden durchgeführt.

Mittels einer Bio-Rad Blotkammer wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech) transferiert. Der Proteintransfer erfolgte im Western-Blot-Puffer für 90min bei 70V. Nach dem Elektrotransfer wurden die Nitrozellulosemembranen entnommen und mit Ponceau S (Sigma) 5min lang gefärbt, um den regelrechten Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen.

Als zusätzliche Kontrolle wurde das verwendete Gel 30min mit Farbstoff Coomassie-Blau (Serva Feinbiochemica) gefärbt, anschließend mit einer Coomassie-Blau-Entfärbelösung 16h entfärbt und getrocknet. Die Proteinbanden, die nicht oder nicht vollständig auf die Nitrozellulosemembran transferiert wurden, stellten sich dann als blaue Bande im Gel dar (siehe verwendete Lösungen [2.7.4](#)).

2.7.3 Immunbiochemische Identifizierung phosphorylierter Proteine in bovinen Spermatozoenextrakten

Zur immunbiochemischen Detektion von tyrosinphosphorylierten Proteinen wurden die Nitrozellulosemembranen, auf denen sich die elektrotransferierten Proteine befanden, mit dem monoklonalen Maus Anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10; Upstate Technologies) inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzudecken, wurden die Nitrozellulosemem-

branen in T-TBS mit 5% w/v Teleostgelatine (Sigma) für 1h präinkubiert. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit 4G10 (1:1000 in T-TBS + 1% BSA verdünnt). Nicht gebundene Antikörper wurden durch 3 x 5min Waschen der Nitrozellulosemembranen in T-TBS entfernt. Als Zweitantikörper wurde ein mit Peroxidase markierter Anti-Maus IgG-Antikörper (Sigma) eingesetzt. Dieser wurde 1:3000 in T-TBS + 1% BSA verdünnt und 30min mit den Nitrozellulosemembranen inkubiert. Die Entfernung nicht gebundener Zweitantikörper erfolgte durch 5 x 10min Waschen der Membranen in T-TBS. Die transferierten biotinylierten Standardproteine wurden in T-TBS mit 5% Milchpulver über 1h blockiert, dann mit Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Bio-Rad; 1:3000 in T-TBS + 5% Milchpulver verdünnt) für 30min inkubiert, und abschließend wurden die Membranstreifen 5 x 10min gewaschen.

Alle Inkubationen und Waschvorgänge der Nitrozellulosemembranen erfolgten unter leichtem Schütteln bei RT.

Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch das Chemilumineszenzverfahren (Abbildung 2.11) detektiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit ECL (enhanced chemiluminescence; Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers 1min beschichtet. Anschließend wurde ECL mit einem Papiertuch abgesaugt und die Nitrozellulosemembranen in Klarsichtfolie verpackt. Das Filmmaterial wurde in einer Fotokassette auf die Klarsichtfolie gelegt. Die Belichtungszeit betrug 1 bis 40min und richtete sich sowohl nach der Intensität der Reaktion als auch nach der Empfindlichkeit des Filmmaterials. Verwendet wurden Röntgenfilm Super RX (Fuji), Röntgenfilm X-OMATTM AR (Kodak) und HyperfilmTM ECLTM (Amersham Pharmacia Biotech).

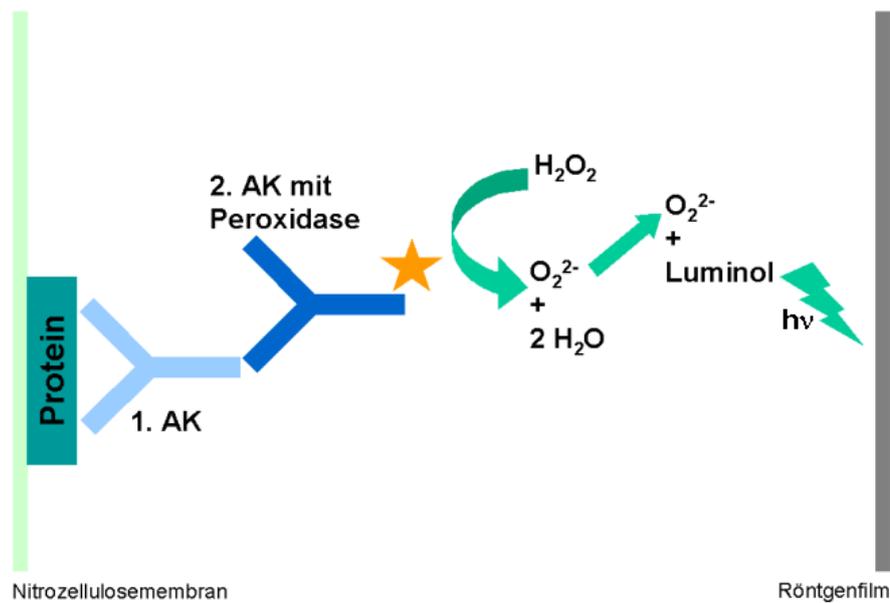


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Chemilumineszenzreaktion. AK = Antikörper, H_2O_2 = Wasserstoffperoxyd, O_2^{2-} = Sauerstoffradikale, $h\nu$ = Energie der emittierten Lichtquanten

2.7.4 Verwendete Lösungen und Materialien für die Elektrophorese und den Western Blot

Extraktionspuffer(Laemmlipuffer 6x konzentriert):

7ml 4x Tris/SDS pH 6,8

3ml Glycerin (Merck)

1g SDS (Gerbu Biotechnik GmbH)

1,2mg Bromphenolblau (Sigma)

Aqua dest. bis 10ml hinzufügen

4x Tris/SDS:

6,05g Tris-Base (Roth) in 40ml Aqua dest.

pH 6,8 einstellen

Aqua dest. hinzufügen bis 100ml

0,4g SDS

Proteasehemmstoffe:

1mM EDTA (Merck)

10mM Benzamidin (Sigma)

2mM Dithiothreitol (Sigma)

0,2mM PMSF (Sigma)

Trenngel 10%ig:

3,3ml 30% Acrylamidlösung (Bio-Rad)

2,5ml Trenngelpuffer

4,1ml Aqua dest.

5 μ l TEMED (Bio-Rad)

50 μ l 10% w/v Ammoniumpersulfatlösung (Bio-Rad)

Sammelgel 4%ig:

1,3ml 30% Acrylamidlösung

2,5ml Sammelgelpuffer

6,1ml Aqua dest.

10 μ l TEMED

50 μ l 10% w/v Ammoniumpersulfatlösung

Sammelgelpuffer:

0,5M Tris, pH 6,8

Trenngelpuffer:

1,5M Tris, pH 8,8

Laufpuffer:

25mM Tris

192mM Glycin (Roth)

0,1% w/v SDS

pH 8,3

Western-Blot-Puffer:

192mM Glycin
25mM Tris
20% v/v Methanol
pH 8,4
0,01% w/v SDS

Coomassie-Blau-Färbelösung:

0,25% w/v Coomassie-Blau (Serva Feinbiochemika)
10% v/v Eisessig (Merck)
45% v/v Methanol
45% v/v Aqua dest.

Coomassie-Blau-Entfärbelösung:

10% v/v Eisessig
45% v/v Methanol
45% v/v Aqua dest.

T-TBS (Tween-Tris buffered saline):

10mM Tris, pH 7,5
100mM NaCl
0,1% v/v Tween 20 (Sigma)

2.8 Chlortetracyclin-Analyse (CTC)

Das Antibiotikum Chlortetracyclin (CTC) kann als ein Indikator für den Kapazitations-Status der Spermatozoen verwendet werden. Ward und Storey [186] erkannten hauptsächlich drei Fluoreszenzmuster in Köpfen von Maus-Spermatozoen. Die prozentuale Anteil der Zellen in jeder Kategorie ändert sich während der Kapazitation. Mit der CTC-Analyse können akrosomreagierte (AR-Muster) und akrosomintakte Spermatozoen differenziert werden. Die Gruppe von akrosomintakten Spermatozoen kann in zwei Untergruppen geteilt werden: Nicht kapazitierte Spermatozoen (F-Muster) und kapazitierte Spermatozoen (B-Muster). Die CTC-Analyse hat sich als eine nützliche Methode für

die Evaluierung des Kapazitation-Status der Spermatozoen verschiedener Spezies erwiesen [49, 69, 74].

In dieser Arbeit wurde die CTC-Analyse verwendet, um die Kapazitation kryokonservierter Spermatozoen während der Inkubation mit Genistein zu untersuchen.

Kryokonservierte Spermatozoen wurden wie zuvor beschrieben aufgetaut und mit dem Swim-up-Verfahren aufbereitet. In allen Versuchen wurde HAM F10 Medium + 0,3% BSA als Medium verwendet. Nach dem Swim-up wurden die Proben geteilt und mit DMSO (0,2 μ l/ml als Kontrolle) oder Genistein (2 μ g/ml) inkubiert. Direkt nach Zugabe von Genistein und nach 4h Kapazitation wurden die Proben mit der CTC-Analyse untersucht.

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wurden gleichzeitig Kapazitationsstatus und Vitalität über die H258-Färbung bestimmt. Die Spermatozoensuspension wurde mit H258 (Endkonzentration 1 μ g/ml) 10min bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit 1ml PBS/2%PVP 5min bei 700xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 50-70 μ l PBS/2%PVP resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 45 μ l entnommen und mit 45 μ l CTC-Färbelösung gut gemischt. Dann wurden 8 μ l Paraformaldehyd-Fixierungslösung hinzupipettiert und gemischt. Pro Probe wurden auf 2 Objektträger jeweils 10 μ l Suspension pipettiert, mit einem Tropfen Citifluor[®] gemischt und mit einem Deckglas abgedeckt. Das Deckglas wurde mit handelsüblichem Nagellack abgedichtet. Die Objektträger wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Anregung 365nm). Pro Probe wurden 200 Spermatozoen (100 Spermatozoen pro Objektträger) untersucht. Drei Färbungsmuster wurden erkannt: **F**, die Spermatozoen zeigten eine gleichmäßige Fluoreszenz im Kopfbereich; **B**, der Akrosombereich war gefärbt, und der post-akrosomale Bereich erschien dunkel; **AR**, das Akrosom zeigte eine geringgradige Fluoreszenz. Zellen mit AR-Muster weisen häufig eine dünne, fluoreszierende Bande im Äquatoralsegment auf (Abbildung 2.12).

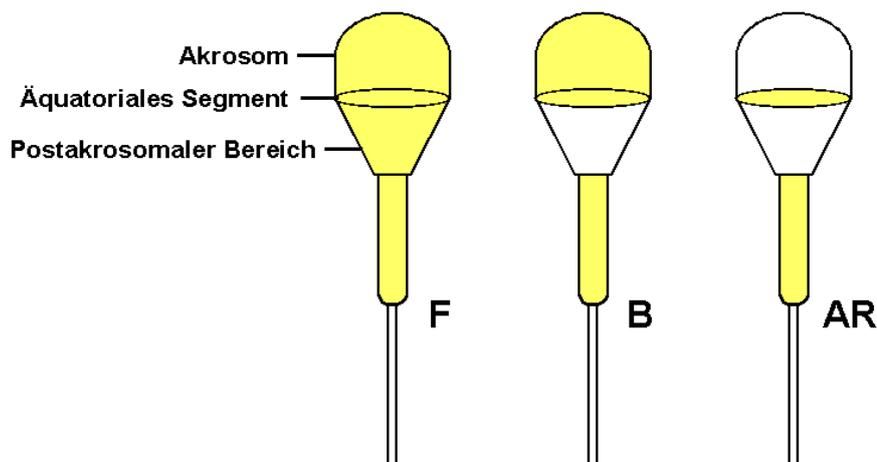


Abbildung 2.12: Chlortetracyclin-Fluoreszenz-Färbungsmuster für nicht kapazitierte (**F**), kapazitierte (**B**) und akrosomreagierte (**AR**) Spermatozoen.

2.8.1 Verwendete Lösungen für die CTC-Analyse

CTC-Färbelösung:

750mM CTC (Sigma)

5mM DL-Cystein (Sigma)

5ml CTC-Puffer

pH 7,8 (eingestellt mit 0,2 M HCl; Merck)

CTC-Fixierlösung:

1 M Tris; pH 7,4

CTC-Paraformaldehydlösung (25%):

25g Paraformaldehyd (Fluka)

100l Aqua dest.

CTC-Paraformaldehyd-Fixierlösung:

1 Volumenteil CTC-Paraformaldehydlösung

1 Volumenteil CTC-Fixierlösung

pH 7,4

CTC-Puffer:

20mM Tris

130mM NaCl

2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden in MS-Excel-Tabellen erfasst. Die Daten in Prozent wurden mit Hilfe der Formel: $y = \arcsin \sqrt{\frac{x}{100}}$ transformiert. Mittelwerte und SEM wurden mit dem Programm InStatTM von Graph Pad[®] errechnet. Für den Vergleich zweier Mittelwerte wurde der zweiseitige Student-*t* Test eingesetzt. Für den Vergleich mehrerer Daten wurde der Tukey Test nach one-way bzw. two-way ANOVA angewendet. Die Ergebnisse der CTC-Analyse wurden mit dem modifizierten Cochran's χ^2 Test analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Kryokonservierung boviner Spermatozoen

Aufgrund inter- und intraindividuelle Unterschiede in der funktionellen Qualität von Ejakulaten kann es zu erhebliche Probleme bei der Reproduzierbarkeit von Untersuchungsreihen geben. Um dies zu verhindern, können kryokonservierte Spermatozoen eingesetzt werden.

Die Kryokonservierung lieferte pro bovinen Ejakulat bis zu 400 Einzelportionen, die in flüssigem Stickstoff bei -196 °C beliebig lange gelagert werden konnten.

Um die Verwendbarkeit von Verdünnern in kryokonservierten Ejakulaten zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Medien, Tris-Eigelb und AndroMed[®], miteinander verglichen. Kryoprotektive Eigenschaften von Tris-Eigelb-Verdünnern basieren auf der membranstabilisierenden Wirkung tierischer Proteine [66]; AndroMed[®] stellt dagegen ein Kryoprotektivum auf Soja-Lecithin-Basis dar. Ejakulate wurden jeweils zur Hälfte in dem Tris-Eigelb-Verdünnern, zur anderen unter Zusatz von AndroMed[®] mit einer Dichte von 100×10^6 Spermatozoen/ml eingefroren. Das Auftauen einzelner Portionsröhrchen ergab annähernd gleiche Werte der Dichte und Motilität der Spermatozoen und garantierte so die Reproduzierbarkeit zeitlich weit auseinanderliegender Experimente.

3.1.1 Motilitätsmessung

In AndroMed[®] oder Tris-Verdünnern kryokonservierte Spermatozoen wurden mit HAM F10 Medium + 0,3% BSA gewaschen und bis zu 4h bei $38,5\text{ °C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0h, 10min, 30min, 1h, 2h und 4h nach Inkubation wurde die Motilität der Spermatozoen untersucht. Die Messung der Gesamtmotilität der Spermatozoen ergab für beide Verdünnern ähnliche zeitabhängige Kurvenverläufe, wobei die Motilität beim Tris-Verdünnern insgesamt bis zu 20% unter der Motilität bei AndroMed[®] lag (Ab-

bildung 3.1).

Die mittleren Unterschiede in der Gesamtmotilität boviner Spermatozoen, die mit Tris-Verdüner bzw. AndroMed[®] eingefroren worden waren, wurden bei jedem gemessenen Zeitpunkt als statistisch signifikant bewertet ($P < 0,01$). Die gemessenen Motilitätswerte am Anfang (T_0) von $73,5 \pm 2,3\%$ bei AndroMed[®] und $59,6 \pm 2,6\%$ bei dem Tris-Verdüner verminderten sich über die Zeitdauer von 4h auf $58 \pm 2,2\%$ bzw. $36,7 \pm 3,8\%$ ($P < 0,01$).

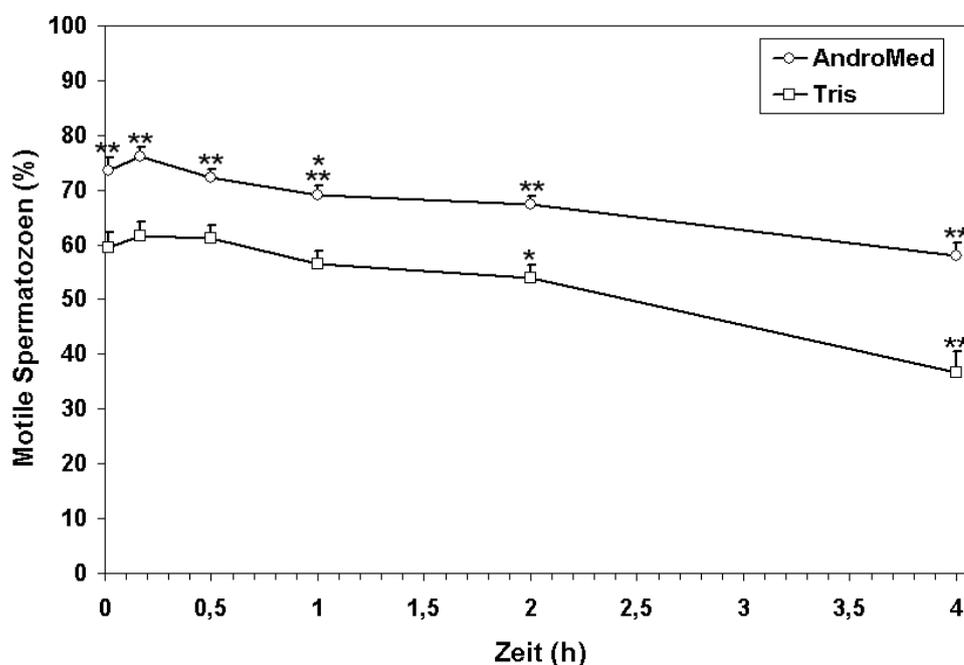


Abbildung 3.1: Motilität boviner Spermatozoen nach Kryokonservierung mit AndroMed[®] oder Tris-Verdüner. Aufgetaute Spermatozoen wurden für insgesamt 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Motilität wurde bei den Zeitpunkten 0h, 10min, 30min, 1h, 2h und 4h mit dem Cell Motion Analyser gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. $n=6$. AndroMed[®] vs. Tris: $**P < 0,01$; AndroMed[®] 4h vs. 0h, 10min, 30min, 1h und 2h: $**P < 0,01$; AndroMed[®] 2h vs. 10min: $**P < 0,01$; AndroMed[®] 1h vs. 10min: $*P < 0,05$; Tris 4h vs. 0h, 10min, 30min, 1h, und 2h: $**P < 0,01$; Tris 2h vs. 30min und 10min: $*P < 0,05$

3.1.2 Induktion der Akrosomreaktion in kryokonservierten Spermatozoen nach dem Swim-up-Verfahren

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, inwieweit Inhaltsstoffe von AndroMed[®] bzw. Tris-Verdüner die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion beeinflussen. Kryokonservierte Spermatozoen wurden aufgetaut und mit dem Swim-up-Verfahren aufbereitet. Nach 4h Kapazitation bei 38,5°C und 5% CO₂ wurde den Spermatozoen 1μM Progesteron oder 1μM ZP3-6 Peptid zugesetzt. Als Kontrolle wurden 0,2μl/ml DMSO bzw. HAM F10 Medium zu der entsprechenden Spermatozoensuspension hinzugegeben. Nach einer 25-minütigen Inkubation mit Zusätzen und chemische Nachweisreagenzien wurde die Akrosomreaktion mit Hilfe des Dualstains (H258/PSA-FITC) untersucht. Die angegebenen Prozentzahlen geben die Mittelwerte der akrosomreagierten lebenden Spermatozoen wieder (Abbildung 3.2).

Die Untersuchung des akrosomalen Status der Spermatozoen direkt nach dem „Swim-up“ ergab $5,8 \pm 1,2\%$ spontan akrosomreagierter lebender Spermatozoen beim verwendeten Tris-Verdüner und $4,5 \pm 1,7\%$ nach Kryokonservierung mit AndroMed[®]. Dieser Unterschied wurde als nicht statistisch signifikant bewertet ($P > 0,05$; Abbildung 3.2).

Die Inkubation kapazitierter Spermatozoen mit 1μM Progesteron führte zu einem Anstieg der akrosomreagierten Samenzellen sowohl in der mit Tris-Verdüner kryokonservierten Probe als auch in den mit AndroMed[®] kryokonservierten Spermatozoen (Abbildung 3.3 A). Bei Spermatozoen, die mit Tris-Verdüner konserviert waren, wurden $7,4 \pm 1,2\%$ spontan akrosomreagierte lebende Spermatozoen in der Kontrollprobe festgestellt. Nach Einsatz von AndroMed[®] betrug die Anzahl spontan akrosomreagierte lebende Spermatozoen $9,3 \pm 0,5\%$. Nach Inkubation mit Progesteron stieg die Anzahl akrosomreagierter lebender Spermatozoen auf $14,4 \pm 2\%$ (Tris-Verdüner) bzw. $15 \pm 2,4\%$ (AndroMed[®]). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Testproben festgestellt werden ($P > 0,05$). Dagegen wurde der Unterschied zwischen Kontrolle und mit Progesteron induzierter Spermatozoen sowohl im Tris-Verdüner als auch in AndroMed[®] als statistisch signifikant bewertet ($P < 0,05$).

Wurden den Spermatozoen 1μM ZP3-6 Peptid zugesetzt, konnte auch hier ein signifikanter Anstieg von lebend akrosomreagierten Spermatozoen in den in AndroMed[®] und in Tris-Verdüner kryokonservierten Proben beobachtet werden (Abbildung 3.3 B).

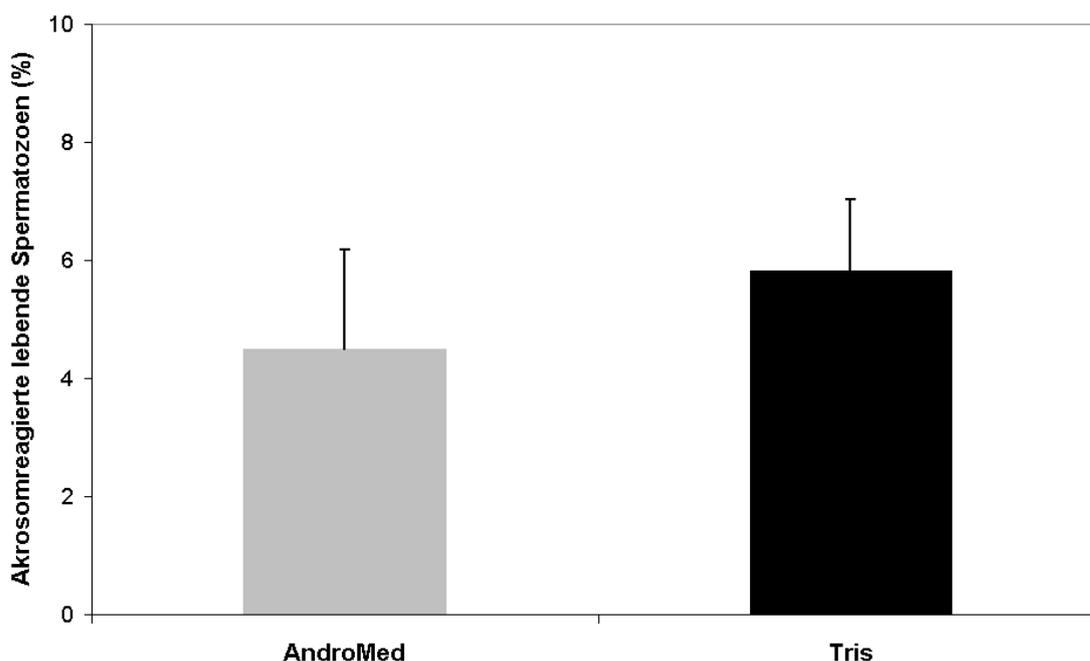


Abbildung 3.2: Akrosomaler Status in bovinen Spermatozoen kryokonserviert in AndroMed[®] oder Tris-Verdünner. Die mit HAM F10 Medium + 0,3% BSA gewaschenen Spermatozoen wurden einem 45-minütigen Swim-up bei 38,5°C und 5% CO₂ unterzogen. Die Auswertung des akrosomalen Status erfolgte unmittelbar nach Ende des Swim-up-Verfahrens mit Hilfe der Hoechst33258/PSA-FITC Doppelfärbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=6.

Im Kontrollansatz betrug die Anzahl lebend akrosomreagiierter Spermatozoen $7,8 \pm 1,8\%$ bei den in Tris-Verdünner konservierten Zellen und $8,5 \pm 1,6\%$ nach Einsatz von AndroMed[®]. Nach Inkubation mit ZP3-6 Peptid war eine Steigerung auf $13,9 \pm 1,9\%$ (Tris-Verdünner) bzw. auf $15,2 \pm 2,7\%$ (AndroMed[®]) zu beobachten. Der Anstieg der Akrosomreaktion zwischen Kontrolle und mit ZP3-6 Peptid induzierte Spermatozoen wurde als signifikant bewertet ($P < 0,05$), während kein signifikanten Unterschied zwischen Tris-Verdünner- und AndroMed[®]-Proben festgestellt werden konnte ($P > 0,05$).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl Progesteron als auch ZP3-6 Peptid zu einem signifikanten Anstieg der Akrosomreaktion in kryokonservierten bovinen Spermatozoen führten. Beide verwendete Kryoprotektiva, Tris-Verdünner und AndroMed[®], zeigen keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion.

Bei aufgetauten Spermatozoen, die mit Tris-Verdünner kryokonserviert waren, konnten ausgeprägte Agglutination beobachtet werden, so dass in den Ausstrichen Gruppen von

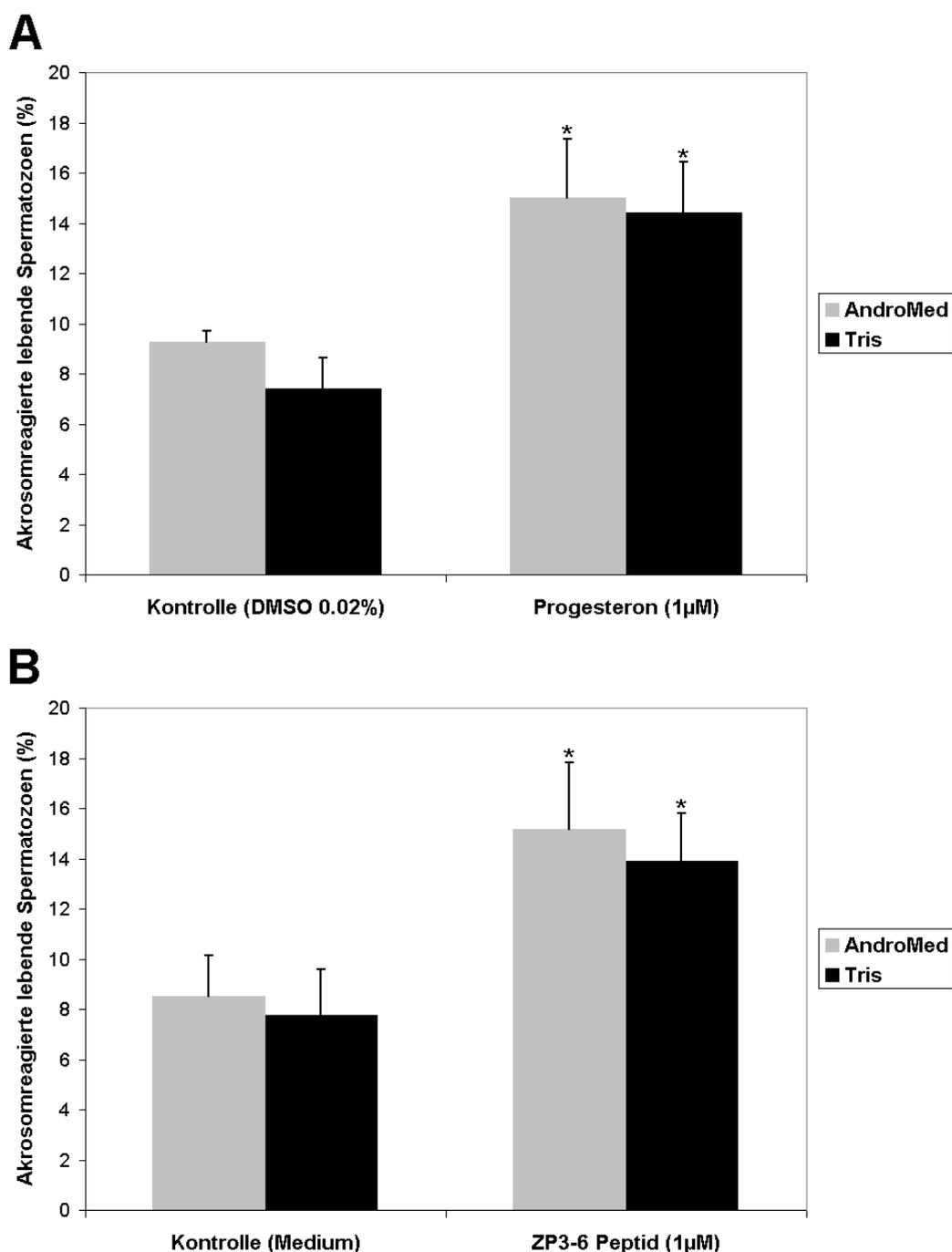


Abbildung 3.3: Induzierbarkeit der Akrosomreaktion in bovinen Spermatozoen kryokonserviert in AndroMed[®] oder Tris-Verdünner. Swim-up-gewonnene Spermatozoen wurden in HAM F10 Medium + 0,3% BSA für 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend 25min mit 1µM Progesteron **(A)** oder 1µM ZP3-6 Peptid **(B)** inkubiert. Als Kontrolle wurden den Spermatozoen 0,02% DMSO bzw. Medium zugesetzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Hoechst33258/PSA-FITC Doppelfärbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=6. Kontrolle vs. Progesteron; Kontrolle vs. ZP3-6 Peptid: *P<0,05.

drei und mehr zusammenliegende Spermatozoen zu sehen waren. In der Regel wurde eine relativ feste Anheftung von mehreren Samenzellen im akrosomalen Bereich des Spermatozoenkopfes beobachtet. Auch wiederholtes Pipettieren führte zu keiner Lösung dieser agglutinierten Spermatozoenköpfe voneinander. Durch diese Agglutination wurde die Auswertung der Akrosomreaktion deutlich erschwert. Dieses Phänomen zeigte sich nicht mit AndroMed[®] kryokonservierten Spermatozoen (Abbildung 3.4).

Für die folgende Experimente wurden deshalb AndroMed[®] kryokonservierte Spermatozoen eingesetzt. Da der Vergleich der beiden Kontrollproben, Zusatz von HAM F10 Medium vs. DMSO 0,02%, keinen signifikanten Unterschied ergab, wurde für die folgenden Versuche HAM F10 Medium als negativ Kontrolle verwendet.

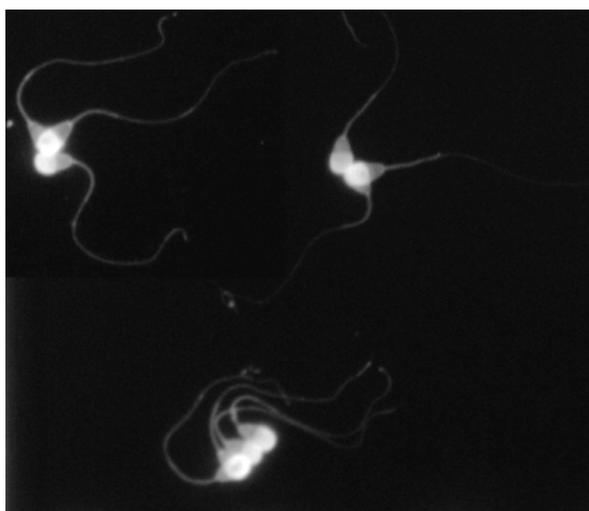


Abbildung 3.4: Agglutination bei bovinen Spermatozoen, die in Tris-Verdünner kryokonserviert wurden. Originalvergrößerung 400x.

3.1.3 Induktion der Akrosomreaktion in kryokonservierten Spermatozoen nach Glaswollsäule-Filtration

In AndroMed[®] kryokonservierte Spermatozoen wurden aufgetaut, mit HAM F10 Medium + 0,3% BSA resuspendiert und durch eine Glaswollsäule filtriert. Die Spermatozoensuspension wurde 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden den Spermatozoen 1μM Progesteron oder 1μM ZP3-6 Peptid zugesetzt. Als Kontrolle wurde

den Spermatozoen entsprechendes Volumen an HAM F10 Medium zugefügt. Nach einer 25-minütigen Inkubation wurde die Akrosomreaktion untersucht. Die angegebenen Prozentzahlen geben die Mittelwerte der akrosomreagierten lebenden Spermatozoen wieder. Der Prozentsatz spontan akrosomreagierter Spermatozoen (Kontrolle) nach 4h Kapazitation lag bei $11 \pm 2,3\%$. Nach Inkubation der Proben mit Progesteron bzw. ZP3-6 Peptid stieg die Anzahl akrosomreagierter lebender Spermatozoen auf $23,2 \pm 3,5\%$ bzw. $23,2 \pm 1,8\%$. Dieser Anstieg der Akrosomreaktion wurde für beide Induktoren als statistisch signifikant bewertet ($P < 0,05$) (Abbildung 3.5).

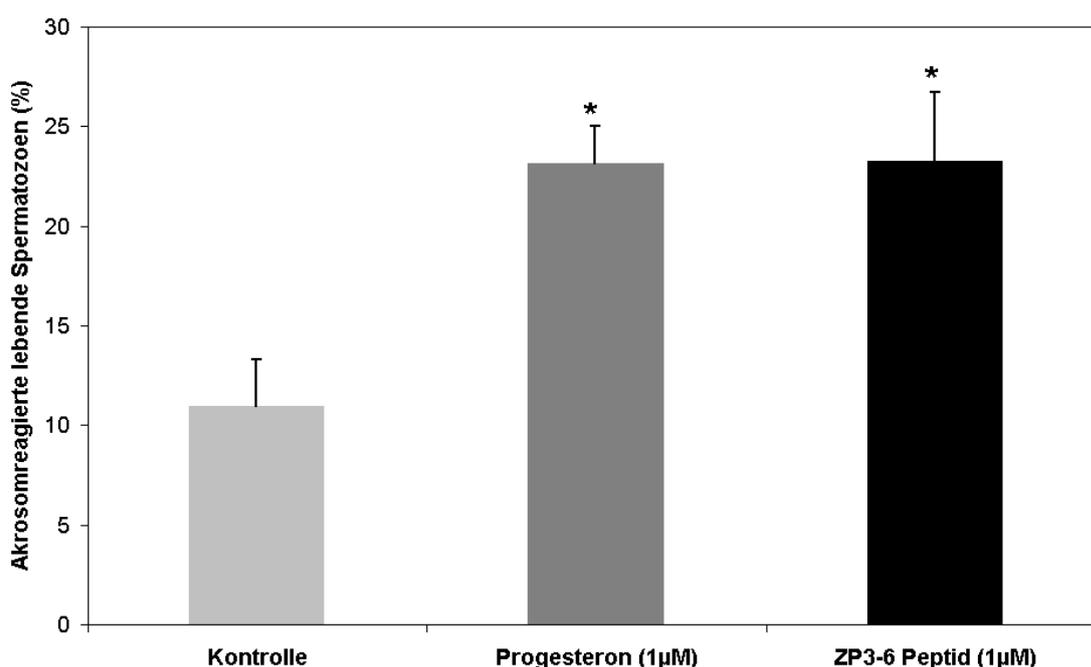


Abbildung 3.5: Induzierbarkeit der Akrosomreaktion in AndroMed[®] kryokonservierten bovinen Spermatozoen nach Glaswollsäule-Filtration. Filtrierte Spermatozoen wurden in HAM F10 Medium + 0,3% BSA für 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend 25min mit 1µM Progesteron oder 1µM ZP3-6 Peptid inkubiert. Als Kontrolle wurde ein entsprechendes Volumen an Medium (HAM F10 + 0,3% BSA) eingesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. n=5. Kontrolle vs. Progesteron; Kontrolle vs. ZP3-6 Peptid; Progesteron vs. ZP3-6 Peptid: *P<0,05.

Die Verwendung von Glaswollsäulen für die Trennung motiler Spermatozoen brachte keine deutliche Verbesserung gegenüber der Swim-up-Methode. Da die Glaswollsäule-Filtration eine sehr aufwendige und kostspielige Methode ist, wurde für die folgende Experimente die Swim-up-Methode bevorzugt.

3.2 Einfluss von Genistein auf die Spermatozoenfunktion

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss von Genistein auf die Motilität, die Vitalität und die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion boviner Spermatozoen untersucht werden. Es wurden sowohl frisch gewonnene Ejakulate als auch in AndroMed[®] kryokonservierte Spermatozoen verwendet. Die Spermatozoen wurden wie unter 2.3 beschrieben mit der Swim-up-Methode aufbereitet und mit Genistein koinkubiert. Nach 4h Kapazitation wurde die Akrosomreaktion mit Progesteron oder ZP3-6 Peptid induziert.

3.2.1 Motilitätsmessung

Frisches Ejakulat

Bei den frisch gewonnenen Spermatozoen lag die Gesamtmotilität direkt nach Zugabe von Genistein ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) oder DMSO ($0,2\mu\text{l}/\text{ml}$, Kontrollprobe) bei 85% bzw. 86%. Nach 2h Inkubation wurde eine Motilität von 84% bei Genistein-behandelten Spermatozoen und 81% bei der Kontrollprobe gemessen. Die Gesamtmotilität nach 4h Inkubation betrug 79% bei Genisteininkubation und 80% bei der Kontrolle (Tabelle 3.1). Beim Vergleich der Motilität der Spermatozoen in der Kontrollprobe zwischen den einzelnen Messpunkten konnte ein signifikanten Unterschied festgestellt werden (0h vs. 2h; 0h vs. 4h: $P < 0,05$). Bei der Genisteinprobe konnte eine statistisch signifikante Abnahme der Motilität erst nach 4h Inkubation ermittelt werden (0h vs. 4h: $P < 0,05$). Der Unterschied zwischen Genistein 2h und Genistein 4h wurde auch als statistisch signifikant bewertet ($P < 0,05$). Zwischen Kontrolle und Genisteinprobe konnte allerdings keinen Unterschied festgestellt werden ($P > 0,05$).

Tabelle 3.1: Motilität frischer boviner Spermatozoen direkt nach Zugabe von Genistein ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) oder DMSO ($0,2\mu\text{l}/\text{ml}$)

	0h	2h	4h
Kontrolle	85,75 ± 0,79% (a)	80,70 ± 2,36% (b)	80,35 ± 2,02% (c)
Genistein	85,13 ± 0,94% (d)	83,65 ± 1,55% (e)	78,58 ± 1,33% (f)

Mittelwerte ± SEM. n=4. a vs. b; a vs. c; d vs. f; e vs. f: $P < 0,05$.

Kryokonservierte Spermatozoen

Die Motilität der kryokonservierten Spermatozoen direkt nach dem Swim-up betrug 85%. Zwei Stunden nach Zugabe von Genistein oder DMSO (Kontrollprobe) lag die Gesamtmotilität bei 80% bzw. 82%. Nach 4h Inkubation wurde eine Motilität von 77% bei Genistein und von 78% bei der Kontrolle gemessen. Die geringe Abnahme der Motilität während der Inkubation wurde in beiden Proben als nicht signifikant bewertet ($P > 0,05$). Es konnte kein Unterschied zwischen Kontrollprobe und Genistein-behandelter Spermatozoen festgestellt werden ($P > 0,05$; Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Motilität kryokonservierter boviner Spermatozoen nach Zugabe von Genistein ($2\mu\text{g/ml}$) oder DMSO ($0,2\mu\text{l/ml}$)

	Swim-up	2h	4h
	$84,94 \pm 1,34\%$		
Kontrolle		$82,30 \pm 1,99\%$	$78,24 \pm 1,99\%$
Genistein		$80,49 \pm 1,56\%$	$77,76 \pm 2,72\%$

Mittelwerte \pm SEM. $n=7$. $P > 0,05$

3.2.2 Vitalität

Frisches Ejakulat

Um zu überprüfen, ob bei der Inkubation der bovinen Spermatozoen mit Genistein kein zytotoxischer Effekt auftrat, wurde die Vitalität der Zellen mit der H258 Färbung untersucht.

Abbildung 3.6 zeigt den Einfluss von Genistein auf die Vitalität frisch ejakulierter boviner Spermatozoen. Die Kontrollspermatozoensuspension (Zusatz von DMSO $0,2\mu\text{l/ml}$) wies zu Beginn des Versuches $92,3 \pm 1,5\%$ vitale Zellen auf. Nach 4h Inkubation verringerte sich dieser Anteil leicht auf $91,8 \pm 1,2\%$. Die Vitalität der mit Genistein inkubierten Spermatozoen verringerte sich in demselben Zeitraum von anfangs $88,7 \pm 1\%$ auf $87,3 \pm 1,4\%$ nach 4h.

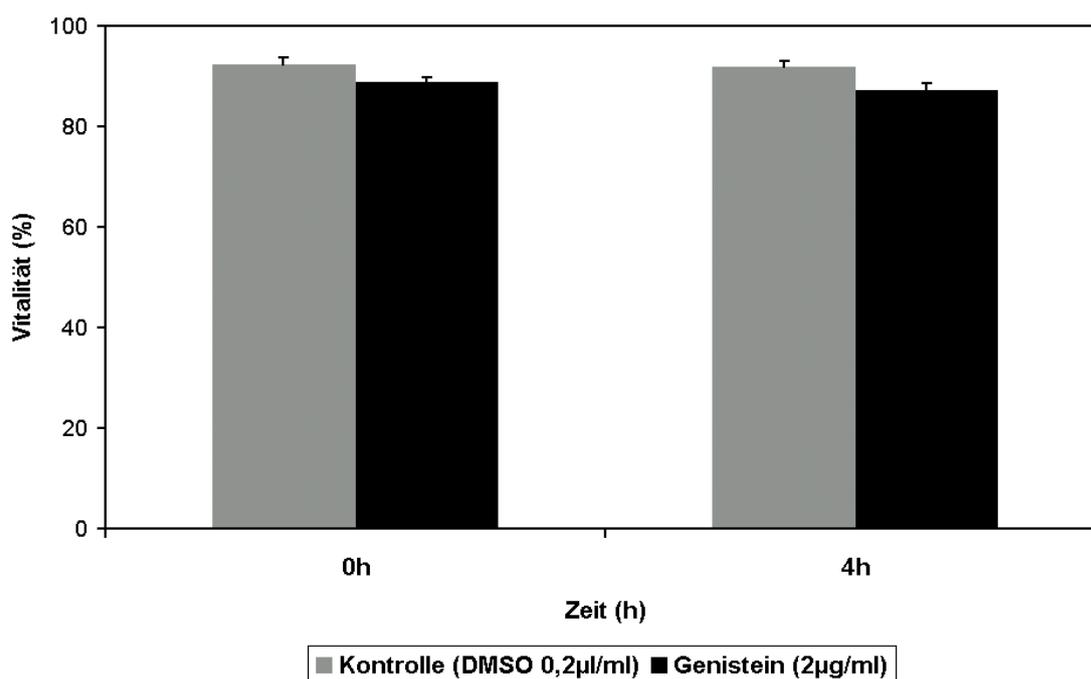


Abbildung 3.6: Einfluss von Genistein auf die Vitalität frisch ejakulierter boviner Spermatozoen. Mittels Swim-up gewonnene Spermatozoen wurden in HAM F10 Medium + 0,3% BSA mit Zugabe von DMSO (0,2µl/ml; Kontrolle) oder von Genistein (2µg/ml) bis zu 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Unmittelbar nach Beendigung des Swim-up sowie nach 4h Inkubation erfolgte die Auswertung der Vitalität mit Hilfe der H258-Färbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. n=4.

Kryokonservierte Spermatozoen

Bei kryokonservierten Spermatozoen konnten ähnliche Werte wie mit frischen Spermatozoen beobachtet werden. Während der Inkubation sank die Anzahl vitaler Zellen von $87,7 \pm 2,1\%$ auf $84,3 \pm 2,5\%$ in der Kontrollprobe und von $90,9 \pm 1,1\%$ auf $85,9 \pm 2,9\%$ in der mit Genistein inkubierten Spermatozoensuspension (Abbildung 3.7) ab.

In beiden Fällen wurde die Abnahme der Vitalität mit der Zeit als nicht signifikant bewertet. Es konnte kein Unterschied zwischen Kontrolle und Genistein-behandelten Spermatozoen festgestellt werden. Somit konnte ein zytotoxischer Effekt von Genistein auf die Spermatozoen ausgeschlossen werden.

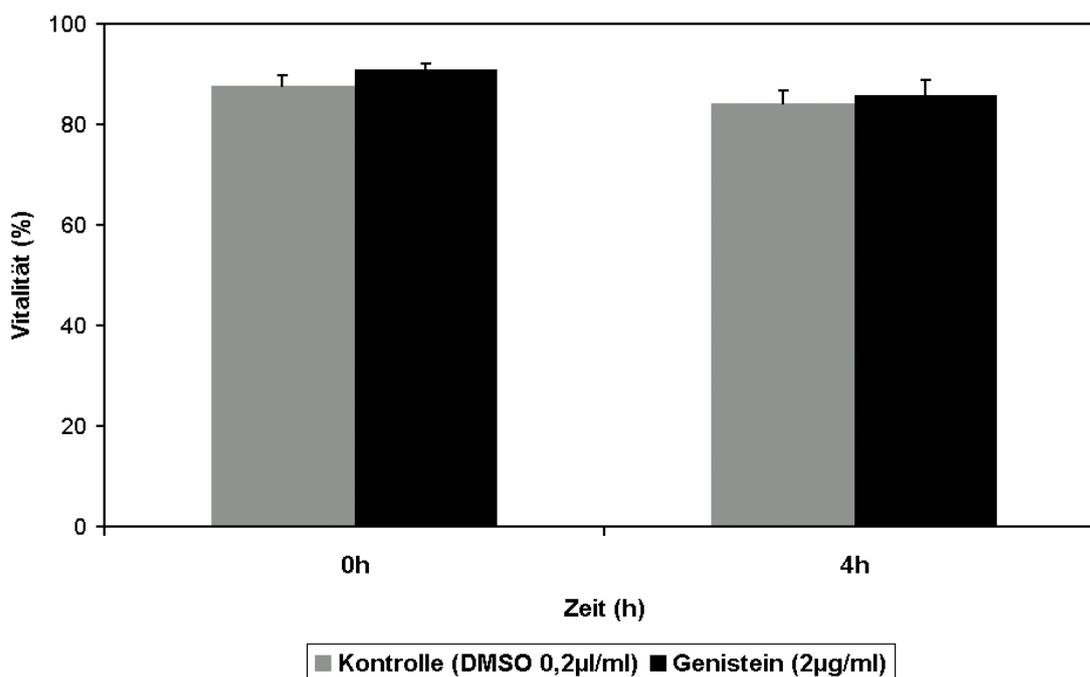


Abbildung 3.7: Einfluss von Genistein auf die Vitalität kryokonservierter, boviner Spermatozoen. Durch Swim-up gewonnene Spermatozoen wurden in HAM F10 Medium + 0,3% BSA mit Zugabe von DMSO (0,2µl/ml; Kontrolle) oder von Genistein (2µg/ml) bis zu 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Unmittelbar nach Beendigung des Swim-up sowie nach 4h Inkubation erfolgte die Auswertung der Vitalität mit Hilfe der H258-Färbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. 0h: n=5; 4h: n=7.

3.2.3 Induzierbarkeit der Akrosomreaktion

Frisches Ejakulat

Bei den frisch gewonnenen Proben betrug der Prozentsatz spontan akrosomreagerter lebender Spermatozoen nach 4h Inkubation mit DMSO (0,2µl/ml, Kontrollprobe) oder Genistein (2µg/ml) $14,3 \pm 2,4\%$ bzw. $11,6 \pm 3,1\%$ (Abbildung 3.8). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Genisteinprobe festgestellt werden (Kontrolle ohne Induktor vs. Genistein ohne Induktor: $P > 0,05$).

Die Inkubation mit 1µM Progesteron führte zu einem Anstieg auf $21,3 \pm 2,7\%$ akrosomreagerter lebender Spermatozoen in der Kontrollprobe (Abbildung 3.8). Dieser Anstieg der Akrosomreaktion wurde als nicht signifikant bewertet (Kontrolle ohne Induktor vs. Kontrolle + Progesteron: $P > 0,05$). Bei den mit Genistein behandelten Spermatozoen

konnte keine Induktion der Akrosomreaktion nach Inkubation mit Progesteron festgestellt werden (Genistein ohne Induktor vs. Genistein + Progesteron: $P > 0,05$). Der Prozentsatz akrosomreagerter lebender Spermatozoen nach Inkubation mit Progesteron lag hier bei $11,3 \pm 1,4\%$. Es konnte aber ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Genisteinprobe beobachtet werden (Kontrolle + Progesteron vs. Genistein + Progesteron: $P < 0,05$).

Wurde die Probe mit $1\mu\text{M}$ ZP3-6 Peptid inkubiert, ergab die Auswertung der Akrosomreaktion $26,6 \pm 4,5\%$ akrosomreagierte lebende Spermatozoen in der Kontrollprobe und $10,8 \pm 0,9\%$ in der Genisteinprobe. In der Kontrolle wurde die Induktion der Akrosomreaktion als statistisch signifikant bewertet (Kontrolle ohne Induktor vs. Kontrolle + ZP3-6 Peptid: $P < 0,05$). Bei den mit Genistein-behandelten Spermatozoen konnte keine Induktion der Akrosomreaktion festgestellt werden (Genistein ohne Induktor vs. Genistein + ZP3-6 Peptid: $P > 0,05$). Der Unterschied zwischen Kontrolle und Genisteinprobe wurde als statistisch signifikant errechnet (Kontrolle + ZP3-6 Peptid vs. Genistein + ZP3-6 Peptid: $P < 0,01$) (Abbildung 3.8).

Kryokonservierte Spermatozoen

Die Auswertung der Akrosomreaktion mit kryokonservierten Spermatozoen ergab $12,6 \pm 2\%$ spontan akrosomreagierte, lebende Spermatozoen in der Kontrollprobe und $14,5 \pm 0,5\%$ in der Genisteinprobe (Abbildung 3.9). Der Vergleich zwischen Kontrolle und Genistein zeigte keine statistische Signifikanz (Kontrolle ohne Induktor vs. Genistein ohne Induktor: $P > 0,05$).

Nach Inkubation der Kontrollprobe mit den Induktoren Progesteron oder ZP3-6 Peptid stieg der Prozentsatz der akrosomreagierten lebenden Spermatozoen auf $26,2 \pm 2,9\%$ bzw. $24,4 \pm 2,4\%$ an (Abbildung 3.9). Die Zunahme akrosomreagerter Spermatozoen konnte als statistisch signifikant bewertet werden (Kontrolle ohne Induktor vs. Kontrolle + Progesteron; Kontrolle ohne Induktor vs. Kontrolle + ZP3-6 Peptid: $P < 0,01$). Bei den mit Genistein behandelten Spermatozoen lag der Prozentsatz akrosomreagerter lebender Spermatozoen nach Inkubation mit Progesteron oder ZP3-6 Peptid bei $15,3 \pm 1,9\%$ bzw. $12,1 \pm 1,5\%$ (Abbildung 3.9). Hier konnte kein signifikanter Unterschied zu der spontanen Akrosomreaktion festgestellt werden (Genistein ohne Induktor vs. Genistein

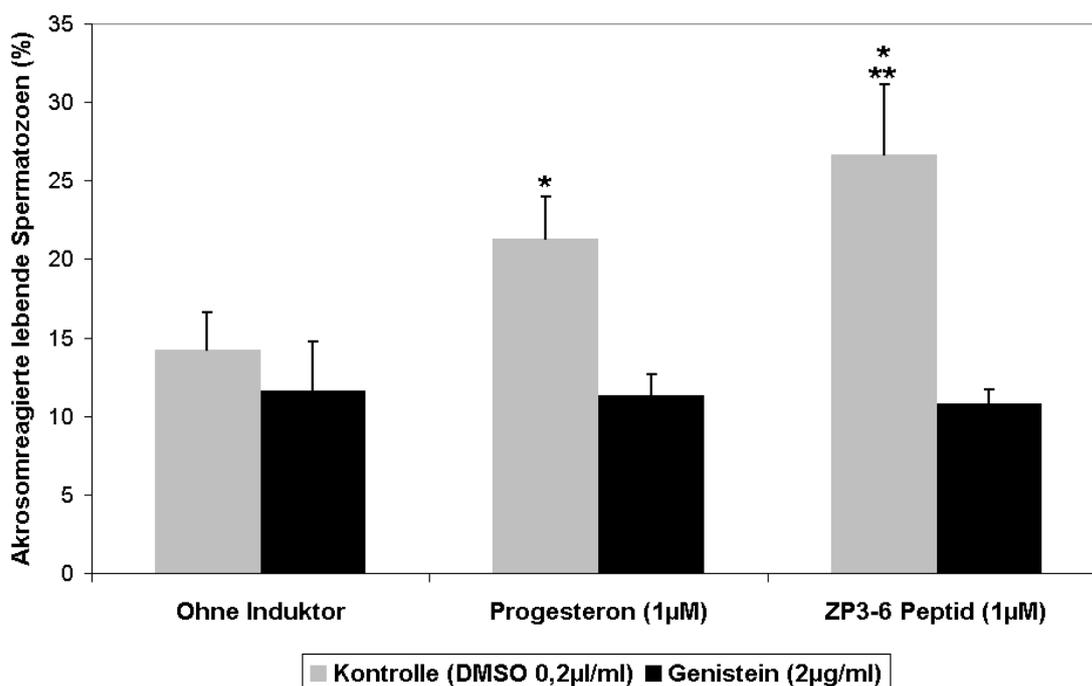


Abbildung 3.8: Einfluss von Genistein auf die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion boviner Spermatozoen aus frischen Ejakulaten. Mittels Swim-up gewonnene Spermatozoen wurden in HAM F10 Medium + 0,3% BSA mit Zugabe von DMSO (0,2µl/ml; Kontrolle) oder Genistein (2µg/ml) bis zu 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ kapazitiert und anschließend 25min mit Progesteron (1µM) oder mit ZP3-6 Peptid (1µM) inkubiert. Die Auswertung erfolgte über die H258/PSA-FITC-Doppelfärbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. n=4. Kontrolle ohne Induktor vs. Kontrolle + ZP3-6 Peptid; Kontrolle + Progesteron vs. Genistein + Progesteron: *P<0,05; Kontrolle + ZP3-6 Peptid vs. Genistein + ZP3-6 Peptid: **P<0,01.

+ Progesteron; Genistein ohne Induktor vs. Genistein + ZP3-6 Peptid: P>0,05). In den mit Progesteron- bzw. ZP3-6 Peptid-induzierten Spermatozoen wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle (DMSO) und Genisteinprobe festgestellt (Kontrolle + Progesteron vs. Genistein + Progesteron; Kontrolle + ZP3-6 Peptid vs. Genistein + ZP3-6 Peptid: P<0,01) (Abbildung 3.9).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Inkubation boviner Spermatozoen mit Progesteron oder ZP3-6 Peptid zu einem Anstieg der Akrosomreaktion führte. Die Induktion der Akrosomreaktion nach Inkubation mit Progesteron konnte nur in den kryokonservierten Spermatozoen als statistisch signifikant bewertet werden (P<0,01). Die Inkubation der Spermatozoen mit ZP3-6 Peptid führte zu einer statistisch signifi-

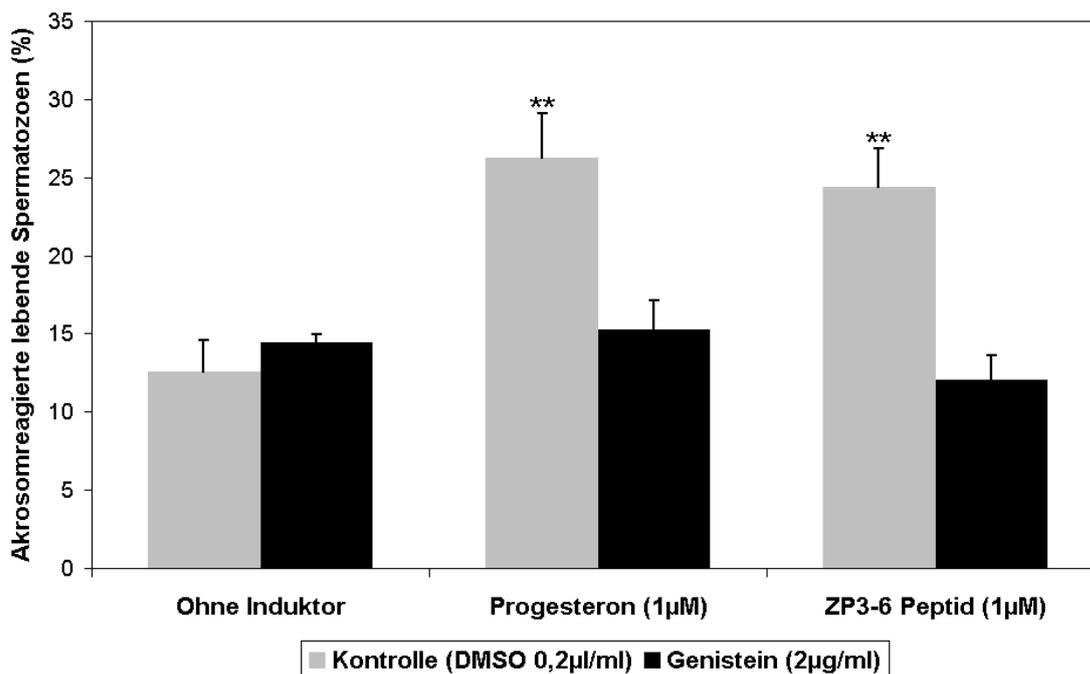


Abbildung 3.9: Einfluss von Genistein auf die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion kryokonservierter boviner Spermatozoen. Durch Swim-up gewonnene Spermatozoen wurden in HAM F10 Medium + 0,3% BSA mit Zugabe von DMSO (0,2µl/ml; Kontrolle) oder Genistein (2µg/ml) bis zu 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ kapazitiert und anschließend 25min mit Progesteron (1µM) oder mit ZP3-6 Peptid (1µM) inkubiert. Die Auswertung erfolgte über die H258/PSA-FITC-Doppelfärbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. n=7. Kontrolle ohne Induktor vs. Kontrolle + Progesteron; Kontrolle ohne Induktor vs. Kontrolle + ZP3-6 Peptid; Kontrolle + Progesteron vs. Genistein + Progesteron; Kontrolle + ZP3-6 Peptid vs. Genistein + ZP3-6 Peptid: **P<0,01.

kanten Induktion der Akrosomreaktion in frischem Ejakulat ($P<0,05$) und in kryokonservierten Spermatozoen ($P<0,01$). Genistein zeigte sowohl in frischem Ejakulat als auch in kryokonservierten Spermatozoen einen hemmenden Effekt auf die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion.

3.3 Proteinphosphorylierung während der Kapazitation

Im folgenden sollte der Einfluss von Genistein auf die Tyrosinphosphorylierung von Spermatozoenproteinen untersucht werden. Dem vorausgehend wurde zunächst die Tyrosinphosphorylierung vor und während der Kapazitation in zwei verschiedenen Inkubationsmedien (siehe 2.7.1) untersucht und dokumentiert, um die Unterschiede im Phosphorylie-

rungsmuster nach Kapazitation von denen der Inkubation mit Genistein zu differenzieren. Die Spermatozoenproteine wurden einem Immunoblot mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper unterzogen. Nach Einsatz von Anti-Phosphotyrosin-Antikörper Klon 4G10 konnten durch das Peroxidase-Chemilumineszenzverfahren im Immunoblot Proteine nachgewiesen werden, die phosphorylierte Tyrosinreste beinhalten.

3.3.1 Einfluss von Kapazitationsmedium und Genistein auf die Tyrosinphosphorylierung

Frisches Ejakulat

TALP-Medium

Die Spermatozoensuspension wurde in TALP-Medium mit oder ohne Zugabe von Heparin, dbcAMP, IBMX und Genistein bis zu 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei den Zeitpunkten 0h, 2h und 4h wurden die Spermatozoenproteine wie unten 2.7.1 beschrieben extrahiert.

Zum Zeitpunkt 0h (Abbildung 3.10, Spur 1 und 7) zeigten sich zwei prominente Proteinbanden mit den relativen Molekularmassen 45kDa und in etwas geringerer Intensität bei 97kDa. In den Bereich von 21-97kDa wurden durch den Anti-Phosphotyrosin-Antikörper mehrere schwach markierte Banden dargestellt.

Nach 2h Kapazitationszeit in TALP-Medium mit Zugabe von Heparin, dbcAMP und IBMX (Abbildung 3.10, Spur 2) war eine Zunahme der Phosphorylierung von Proteinen im Bereich von 34-100kDa zu verzeichnen. Diese Zunahme bezieht sich sowohl auf die Intensität der Markierung als auch auf die Anzahl der phosphorylierten Proteinbanden. Dagegen wurden bei der Kontrollprobe (Spermatozoen inkubiert in TALP-Medium ohne Zusätze) keine Veränderungen im Tyrosinphosphorylierungsmuster festgestellt (Abbildung 3.10, Spur 8).

Wurden die Spermatozoen 4h in TALP-Medium mit Zugabe von Heparin, dbcAMP und IBMX (Abbildung 3.10, Spur 3) inkubiert, konnte eine Zunahme der Phosphorylierung in Form einer Erhöhung der Intensität der Markierungen im Bereich von 34-100kDa gegenüber 0h und 2h Inkubationszeit beobachtet werden. Ebenso wurden zusätzliche stark markierte Banden im oberen Molekularmassenbereich von 82-204kDa detektiert.

In der Kontrollprobe zeigte sich nach 4h Kapazitation eine Zunahme in der Intensität

der Markierung bei 0h und 2h beobachteten Proteinbanden (Abbildung 3.10, Spur 9). Die Proteinbande mit einer apparenten Molekularmasse von 45kDa wies keinerlei Veränderungen bezüglich der Markierungsintensität während der Kapazitation auf. Dies traf sowohl für die Kontrollprobe wie auch für Spermatozoen zu, die mit Heparin, dbcAMP und IBMX und Genistein behandelt wurden.

Genistein zeigte keinen Einfluss auf die Veränderungen in der Tyrosinphosphorylierung während der Kapazitation. Dies geschah weder in der Kontrollprobe noch in der Probe mit Zugabe von Heparin, dbcAMP und IBMX (Abbildung 3.10, Spur 4-6 und 10-12).

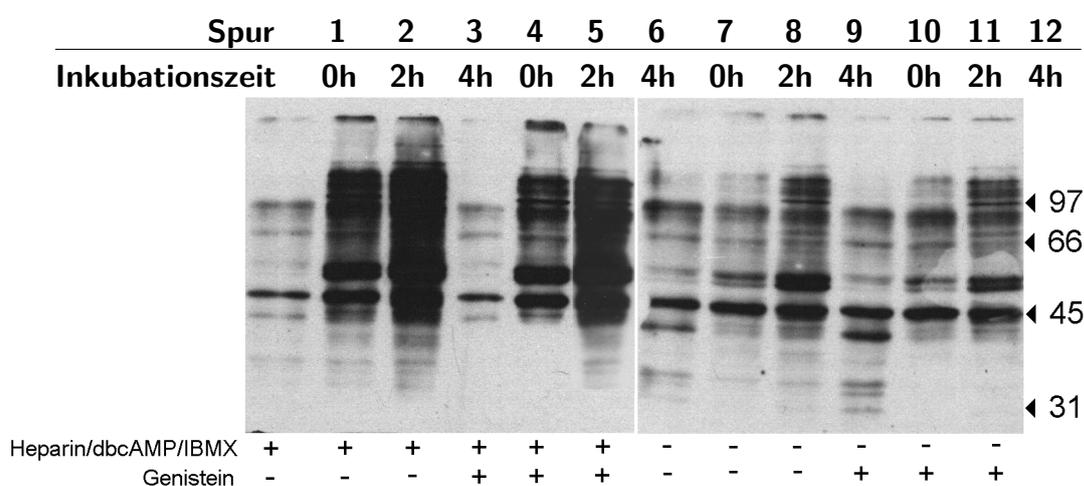


Abbildung 3.10: Immunoblot frisch ejakulierter boviner Spermatozoen mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper Klon 4G10 in der Verdünnung 1:1000. Rechts, Molekularmassen des mitgeführten Proteinstandards in kDa. Je $1,5 \times 10^6$ Spermatozoen wurden zum Zeitpunkt 0, 2 und 4h nach Inkubation in TALP-Medium mit oder ohne Zugabe von kapazitationsfördernden Zusätze (Heparin, dbcAMP und IBMX) und Genistein in Probenpuffer extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

HAM F10 Medium

Die Spermatozoen wurden in HAM F10 Medium + 0,3% BSA mit oder ohne Zugabe von Heparin, dbcAMP, IBMX und Genistein für 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Proteinextraktion erfolgte bei den Zeitpunkten 0h, 2h und 4h Inkubation.

Zum Zeitpunkt 0h (Abbildung 3.11, Spur 1 und 7) wurde ein ähnliches Phosphorylierungsmuster wie unter TALP-Medium beobachtet. Zusätzlich zu den oben beschriebene Proteinbanden zeigte sich eine stark markierte Bande bei 66kDa.

Im Gegensatz zum TALP-Medium konnte bei HAM F10 unter Zugabe von Heparin, dbcAMP und IBMX und in der Kontrollprobe keine Veränderung im Phosphorylierungsmuster während der Kapazitation festgestellt werden (Abbildung 3.11, Spur 1-3 und 7-9). Auch hier konnte kein Einfluss von Genistein beobachtet werden (Abbildung 3.11, Spur 4-6 und 10-12). Auch hier blieb die 45kDa Proteinbande unverändert während der Inkubationszeit in beiden Proben.

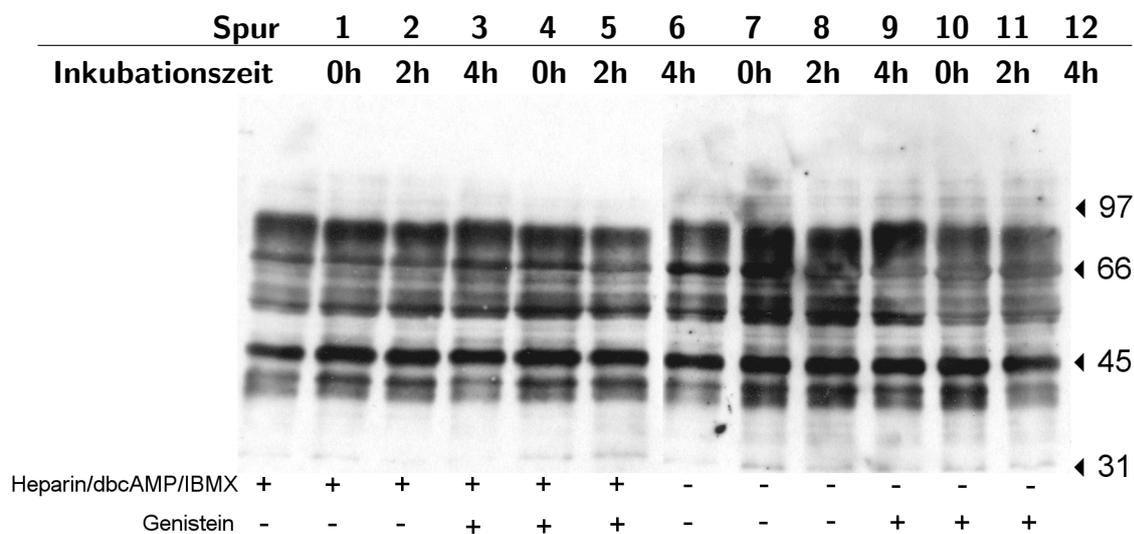


Abbildung 3.11: Immunoblot frisch ejakulierter boviner Spermatozoen mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper Klon 4G10 in der Verdünnung 1:1000. Rechts, Molekularmassen des mitgeführten Proteinstandards in kDa. Je $1,5 \times 10^6$ Spermatozoen wurden zum Zeitpunkt 0, 2 und 4h nach Inkubation in HAM F10 Medium mit oder ohne Zugabe von kapazitationsfördernden Zusätze (Heparin, dbcAMP und IBMX) und Genistein in Probenpuffer extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

Kryokonservierte Spermatozoen

TALP-Medium

Zum Zeitpunkt 0h (Abbildung 3.12, Spur 1 und 7) zeigten sich zwei stark markierte Proteinbanden mit relativen Molekularmassen von 45 und 67kDa. Außerdem wurde eine Anzahl weiterer schwach markierter Banden von dem Antiphosphotyrosin-Antikörper dargestellt. Bei der Kontrollprobe (Abbildung 3.12, Spur 7) zeigte sich eine relativ starke Markierung der Proteine; eine Erklärung dafür ist wahrscheinlich, dass die Proteinmenge in dieser Spur höher war als in den anderen Spuren. Diese Annahme wurde durch eine Coomassie Blau Anfärbung der Proteinbanden im Gel bestätigt.

Nach 2h Kapazitationszeit wurden keine Veränderungen im Tyrosinphosphorylierungsmuster festgestellt (Spur 2 und 8).

Nach 4h Inkubation in TALP-Medium nahm unter Zugabe von Heparin, dbcAMP und IBMX (Abbildung 3.12, Spur 3) die Intensität der Markierung in dem Bereich 44-120kDa gegenüber 0h und 2h Inkubationszeit zu. Zusätzliche stark markierte Banden im oberen Molekularmassenbereich (82-200kDa) waren zu beobachten.

Bei der Kontrollprobe nach 4h Kapazitation (Abbildung 3.12, Spur 9) zeigten die Proteinbanden keine wesentlichen Veränderungen in der Intensität der Markierung.

Die Unterschiede in der Intensität der Markierung der 45kDa Proteinbande in der Kontrollprobe während der Kapazitation beruhen sehr wahrscheinlich auf einer ungleichmäßigen Proteinmenge (siehe oben).

In keiner der beiden Probenansätze zeigte Genistein einen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung während der Kapazitation (Abbildung 3.12, Spur 4-6 und 10-12).

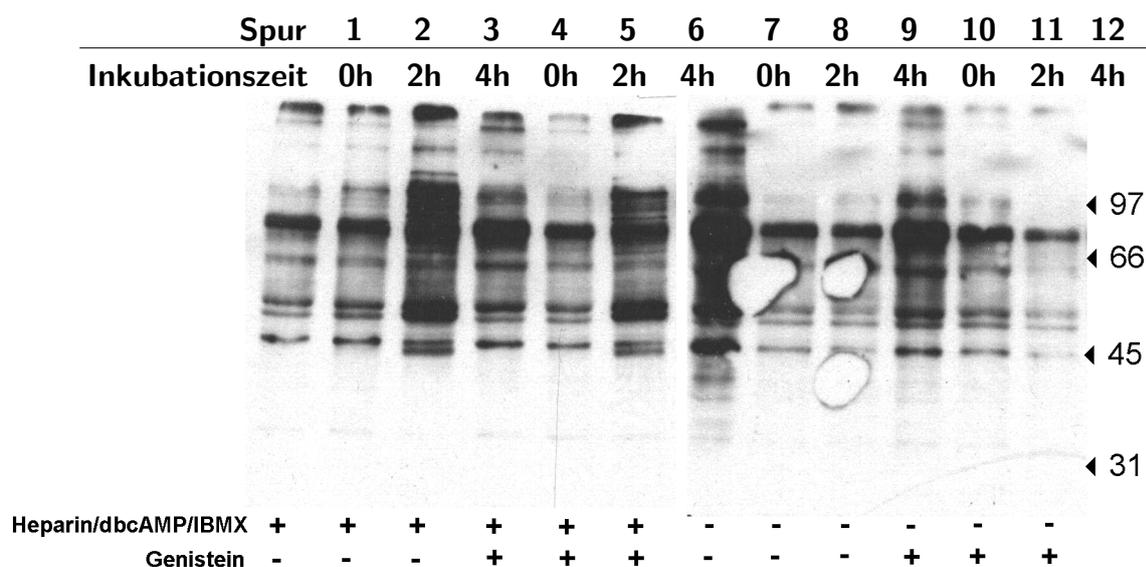


Abbildung 3.12: Tyrosinphosphorylierung kryokonservierter boviner Spermatozoenproteine nach Inkubation in TALP-Medium mit oder ohne Zugabe von kapazitationsfördernden Zusätze (Heparin, dbcAMP und IBMX) und Genistein. Im Immunoblot wurden phosphorylierte Proteine mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper Klon 4G10 (1:1000 verdünnt) markiert und im Chemilumineszenzverfahren dargestellt. Pro Spur wurden die Extrakte aus ca. $1,5 \times 10^6$ bovinen Spermatozoen aufgetragen. Rechts, Molekularmassen des mitgeführten Proteinstandards in kDa. Ein typisches Experiment ist dargestellt.

HAM F10 Medium

Die Proben zeigten ein ähnliches Phosphorylierungsmuster wie bei dem TALP-Medium. Bei HAM F10 unter Zugabe von Heparin, dbcAMP und IBMX konnte eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung von einer großen Anzahl von Proteinen mit unterschiedlichen apparenten Molekularmassen während der Kapazitation beobachtet werden (Abbildung 3.13, Spur 1-3). In der Kontrollprobe wurde keine Veränderung des Phosphorylierungsmusters während der Kapazitation festgestellt (Abbildung 3.13, Spur 7-9). Auch hier konnte kein Einfluss von Genistein auf die Proteintyrosinphosphorylierung beobachtet werden (Abbildung 3.13, Spur 4-6 und 10-12).

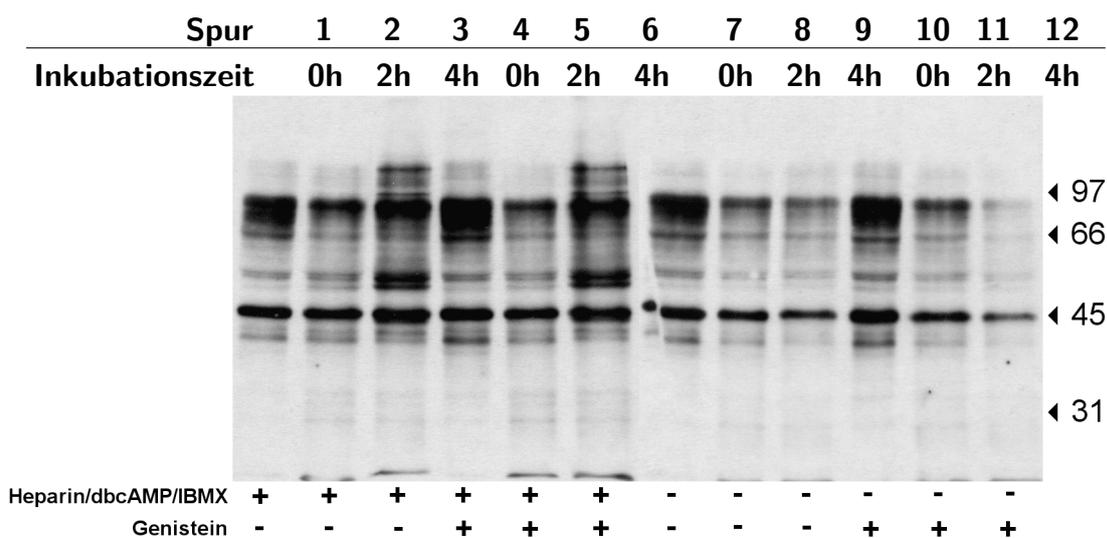


Abbildung 3.13: Tyrosinphosphorylierung kryokonservierter boviner Spermatozoenproteine nach Inkubation in HAM F10 Medium mit oder ohne Zugabe von kapazitationsfördernden Zusätze (Heparin, dbcAMP und IBMX) und Genistein. Im Immunoblot wurden phosphorylierte Proteine mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper Klon 4G10 (1:1000 verdünnt) markiert und im Chemilumineszenzverfahren dargestellt. Pro Spur wurden die Extrakte aus ca. $1,5 \times 10^6$ bovinen Spermatozoen aufgetragen. Rechts, Molekularmassen des mitgeführten Proteinstandards in kDa. Ein typisches Experiment ist dargestellt.

3.4 Chlortetracyclin-Analyse

Kryokonservierte, bovine Spermatozoen wurden wie unter 2.8 beschrieben verarbeitet. Bei den Zeitpunkten 0h und 4h nach Zugabe von DMSO ($0,2 \mu\text{l}/\text{ml}$, Kontrolle) oder Genistein ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) wurden die Spermatozoen mit CTC gefärbt. Die angefertigte Objektträger wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop evaluiert und bezüglich der drei Färbungsmuster (F, B und AR) klassifiziert.

Während der 4h Inkubation konnte eine Veränderung in der Verteilung der Spermatozoen in den drei Kategorien festgestellt werden. In der Kontrollprobe wurde eine Abnahme des F-Musters von $84,8 \pm 3,6\%$ auf $62,4 \pm 6,8\%$ der Spermatozoen beobachtet ($P < 0,01$); dieses wurde von einer Zunahme des B-Musters von $11,3 \pm 2,4\%$ auf $28,1 \pm 6,3\%$ der Spermatozoen ($P < 0,01$) begleitet. Der Prozentsatz der Spermatozoen mit AR-Muster nahm von $4 \pm 1,2\%$ auf $9,5 \pm 1,1\%$ ($P < 0,05$) leicht zu (Abbildung 3.14).

In der Genisteinprobe wurde eine ähnliche Verteilung beobachtet. Die Auswertung ergab eine Abnahme der Spermatozoen mit F-Muster von $85,3 \pm 3,2\%$ auf $63,6 \pm 3,2\%$ ($P < 0,01$), begleitet von einer Zunahme des B-Musters von $9,4 \pm 3\%$ auf $27,6 \pm 3,4\%$ der Spermatozoen ($P < 0,01$); der Prozentsatz der Spermatozoen mit AR-Muster zeigte keine statistisch signifikante Veränderung ($5,38 \pm 1,21\%$ bei 0h und $8,75 \pm 1,32\%$ bei 4h). Es konnte kein Unterschied zwischen Kontrolle und Genisteinprobe festgestellt werden (Abbildung 3.14).

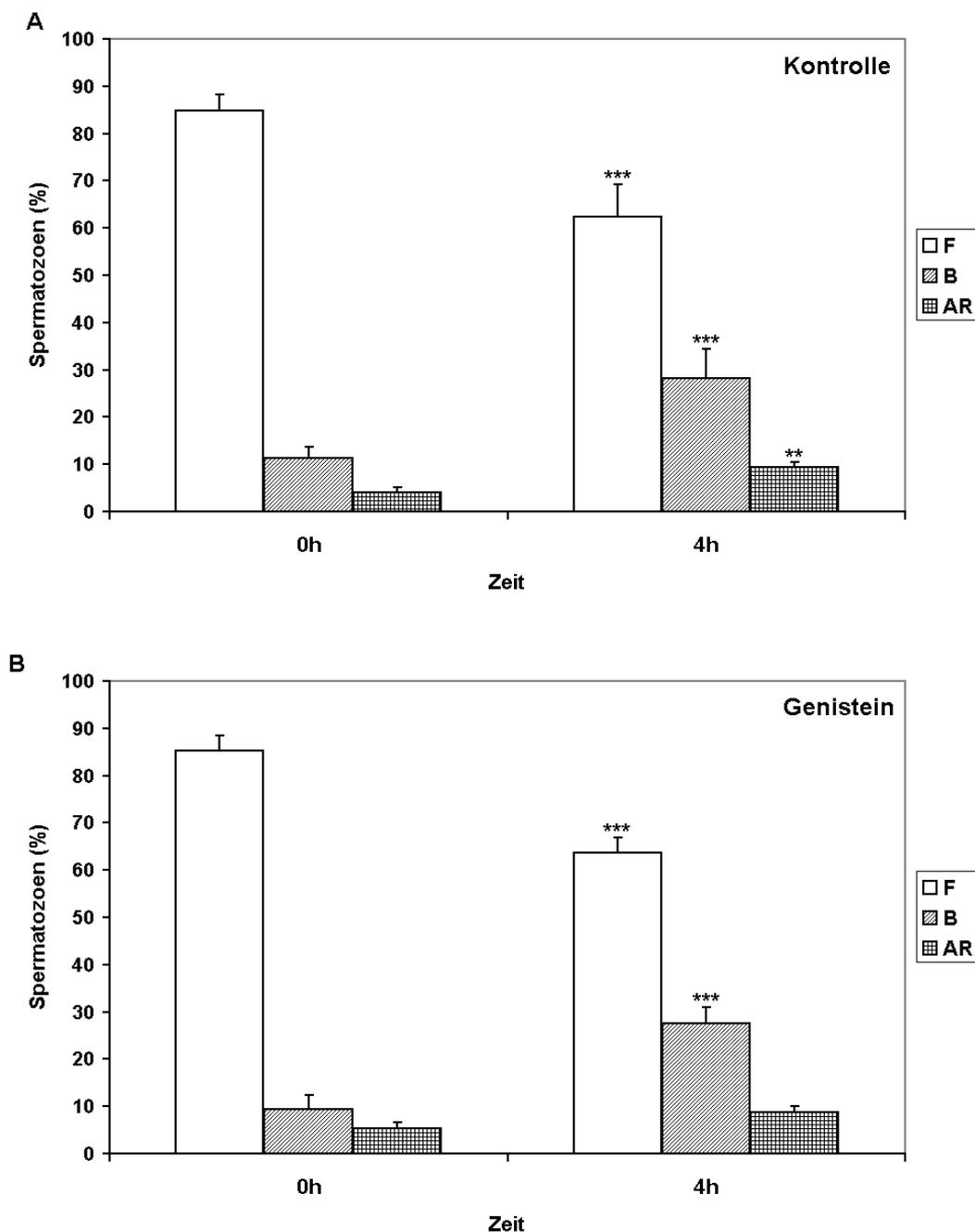


Abbildung 3.14: Nachweis der Kapazitation kryokonservierter boviner Spermatozoen mit Hilfe der CTC-Methode. Swim-up-gewonnene Spermatozoen wurden in HAM F10 Medium + 0,3% BSA unter Zugabe von DMSO (0,2 μ l/ml; Kontrolle) oder von Genistein (2 μ g/ml) bis zu 4h bei 38,5°C und 5% CO₂ inkubiert. Das CTC-Muster wurde direkt nach Zugabe von DMSO oder Genistein oder B) nach 4h Inkubation untersucht. **A)** Kontrollprobe, **B)** Genisteinprobe. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n=4. ***P<0,01; **P<0,05 vs. 0h

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem reproduzierbaren Testsystem Substanzen zu untersuchen, die einen direkten Einfluss auf essenzielle Spermatozonenfunktionen haben. Als Test-System wurden sowohl frische als auch kryokonservierte bovine Spermatozonen eingesetzt; als Leitsubstanz wurde Genistein, ein Phytoöstrogen, das von Mensch und Tier mit der Nahrung aufgenommen wird, gewählt. Die zweite Aufgabestellung der Arbeit war, die molekulare Mechanismen aufzudecken, über die Genistein zu einer Beeinträchtigung der Spermienfunktion führt.

4.1 Umweltbedingte Unfruchtbarkeit

Die Erkenntnis, dass umweltbedingte Einflüsse die Reproduktionsfähigkeit bei bedrohten Tierarten einschränken und die stetig steigende Anzahl ungewollt kinderloser Paare in den westeuropäischen Industrienationen hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass der kausalen Verknüpfung von Umwelteinflüssen und Unfruchtbarkeit vermehrt Aufmerksamkeit entgegengebracht wird. Insbesondere retrospektive, epidemiologische Untersuchungen beim Menschen werden in den Medien äußerst plakativ dargestellt und in vielen Fällen auch kontrovers diskutiert (Nur noch halbe Männer, Der Spiegel (9) 1996: 226-239; Eklat um das Ejakulat, Die Zeit (16) 1996: 33).

Prävention und kausale Therapie umweltbedingter Fertilitätsstörungen erfordern das Wissen um potenzielle Störfaktoren. Eine Reihe von wissenschaftlich und epidemiologisch orientierten Publikationen weisen auf mögliche kausale Zusammenhänge von Umwelteinflüssen und Infertilität bei Tier [11, 43, 79] und Mensch [14, 38] hin.

4.2 Umweltnoxen und männliche Infertilität

Im Seminalplasma nachgewiesen, aber betreffend ihrer reproduktionstoxischen Relevanz kontrovers diskutiert, werden insbesondere Metallsalze wie Kadmium, Quecksilber oder Selen [7, 93, 150, 195] sowie Pestizide und Herbizide. Pflanzenschutzmittel auf der Basis chlorierter Kohlenwasserstoffe wie DDT und PCB werden im Fettgewebe gespeichert, dort nur langsam abgebaut und finden sich angereichert in Sekreten des Reproduktionstraktes. Im Seminalplasma lassen sich diese Substanzen gut nachweisen [57]. In einer der wenigen klinischen Studien zu diesem Thema wurden höhere Konzentrationen dieser Umweltschadstoffe in der Samenflüssigkeit von Männern mit sogenannter „idiopathischer Sterilität“ als in fertilen Vergleichsgruppen nachgewiesen [183]. Entgegengesetzte Ergebnisse wurden von einer anderen Arbeitsgruppe erhoben, die keine Korrelation zwischen der Konzentration polychlorierter Kohlenwasserstoffe und Spermioigrammparametern fanden [61]. Auch in der Follikelflüssigkeit konnten nicht unerhebliche Konzentrationen umweltrelevanter Chemikalien gefunden werden. Eine Studie, in der der Gehalt an polychlorierten Kohlenwasserstoffen in Follikelflüssigkeit bestimmt wurde, zeigte, dass bei Frauen mit erfolglosen IVF Behandlungszyklen erhöhte Konzentrationen dieser Substanzen gefunden wurden [23]. Klinische Beobachtungen können zwar Anhaltspunkte für einen direkten Zusammenhang zwischen Erkrankung und Umweltnoxe geben, sind aber keinesfalls beweisend. Spekulationen und sensationellen Berichten sind deshalb Tür und Tor geöffnet. Diese Berichte tragen erheblich zur Verunsicherung der betroffenen Patienten bei.

Relativ gut dokumentiert und deshalb Gegenstand intensiver Diskussion sind tierexperimentelle und epidemiologische Untersuchungen von potenziell reproduktionstoxikologisch relevanten Chemikalien mit östrogenen Aktivität (Xenoöstrogene). Die Erkenntnis, dass diese Umweltchemikalien Wirkungen entfalten können, die zumindest teilweise denen natürlicher Östrogene entsprechen, ist schon seit den 60er Jahren bekannt [170]. Neuere Beobachtungen zur Geschlechtsdifferenzierung und Reproduktion von Wildtieren geben Anlass zu der Annahme, dass in der Umwelt weit verbreitete Xenoöstrogene von reproduktionstoxikologischer Relevanz sein könnten [43, 79]. Grundlage für diese Hypothese waren Studien, welche die Wirkung von synthetischen Östrogenen in Tierversuchen beschrieben [11]. Ein weiterer Anhaltspunkt, der diese Hypothese unterstützt,

waren Untersuchungen, die Stillman und Mitarbeiter (1982) [161] durchgeführt haben. In der falschen Annahme, mit synthetischen Östrogenen therapeutisch Fehlgeburten verhindern zu können, wurden Schwangeren zwischen 1940 und 1970 Diethylstilbestrol (DES) verabreicht. Bei den Untersuchungen der Söhne ergaben sich dann statistisch erhöhte Inzidenzen von Kryptorchismus, Hypospadien und eine Erniedrigung der Spermatozoenkonzentration.

4.3 Reproduktionstoxikologische *in vitro*-Untersuchungen

Ein wesentlicher Faktor für die verhältnismäßig geringe Anzahl fundierter wissenschaftlicher Aussagen über kausale Zusammenhänge ist, dass Tier- und *in vitro*-Modelle für die Untersuchung der Wirkung von Einzelnoxen auf bestimmte Fertilitätsparameter nur beschränkt zur Verfügung stehen [125]. Nur wenige experimentelle Studien befassen sich mit direkten kurz- oder mittelfristigen Veränderungen von Spermatozoenfunktionen durch Umweltschadstoffe. In diesen Untersuchungen wurden fast ausschließlich die Bewegungsaktivität und das Motilitätsmuster von Spermatozoen in Zusammenhang mit umweltrelevanten Noxen gebracht. Eingesetzt wurden in der Regel Samenzellen von Labortieren, die mit verschiedenen Chemikalien behandelt wurden [168, 198].

In vitro-Zytotoxizitätsstudien mit Bullen Spermatozoen wiesen eine Korrelation zwischen Motilitätsparametern, Zelltod oder ATP-Gehalt einerseits und der Behandlung mit verschiedenen potenziell toxischen Substanzen andererseits auf [94, 157, 158]. Eine erst kürzlich erschienene Arbeit weist mit *in vitro*-Methoden auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Platinsalzen und dem akrosomalen Status humaner Spermatozoen hin [98]. Veränderungen im Bindungsverhalten von Spermatozoen an die Eizelle durch umweltrelevante Chemikalien sind bisher experimentell noch nicht evaluiert worden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es *in vitro*-Untersuchungen gibt, die einen Zusammenhang zwischen Beeinträchtigungen von Spermatozoenfunktionen und relevanten Umweltnoxen herstellen können. Diese Studien sind jedoch in der Regel auf einzelne Spermatozoenfunktionen fokussiert und bieten somit nur ein relativ grobes Untersuchungsraaster.

4.4 In vitro-Modelle zur Evaluierung von Spermatozoenfunktionen

Die wesentlichen Grundlagen der Bekämpfung und Prävention von Infertilität bilden das Verstehen der physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge, die zur Unfruchtbarkeit bei Mensch und Tier führen können. *In vitro*-Testmodelle zur Identifizierung möglicher reproduktionstoxikologisch relevanter Einflüsse auf Spermatozoenfunktionen stehen nur sehr begrenzt zur Verfügung. Solche Testmodelle könnten auf die potenziell schädigende Wirkung von Einzelnoxen bei Männern hinweisen.

Eine Kombination von *in vitro*-Testsystemen für essenzielle Spermatozoenfunktionen kann als feinmaschiges Untersuchungsraaster wissenschaftlich fundierte Aussagen über die Relevanz potenziell reproduktionstoxischer Noxen ermöglichen. Zielgruppen sind der Mensch sowie Haus-, Nutz- und Wildtiere, die in zunehmendem Maße mit anthropogenen Stoffen in Kontakt kommen.

Als Screening-System kann eine Kombination von fünf Funktionsparametern eingesetzt werden: Die Zellmotilitätsanalyse, die Vitalität der Zelle, der akrosomale Status, die Auslösbarkeit der Akrosomreaktion durch physiologische Induktoren und das Bindungsverhalten von Spermatozoen an die Zona pellucida. Wegen der guten Verfügbarkeit der Gameten als Testzellen ist das bovine Modell hierfür besonders gut geeignet. Grundsätzlich gibt es bei der Validierung von *in vitro*-Modellen zur Überprüfung von Spermatozoenfunktionen erhebliche Probleme betreffend der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Diese Beobachtung wird bei männlichen und weiblichen Gameten gemacht und kann experimentelle Erhebungen empfindlich erschweren. Besonders auffällig sind z.B. inter- und intraindividuelle Unterschiede betreffend der Induktion der Akrosomreaktion des Spermatozoons [141]. Bei der Eizelle gibt es eine große Variationsbreite in der Bindungskapazität von Samenzellen [67], wobei die Fertilisationsrate unabhängig von einer großen oder relativ kleinen Anzahl gebundener Spermatozoen ist. Eine plausible Erklärung für diese wahrscheinlich multifaktoriell bedingten Phänomene gibt es nicht. Aus diesen Gründen muss großer Wert auf das experimentelle Design und die Auswahl der Methoden gelegt werden.

Die Kryokonservierung vereinigter boviner Ejakulate (Aufbau einer Spermatozoenbank für Testzwecke) und die funktionelle Charakterisierung der Samenzellen aus mehreren

Ejakulaten (Kalibrierung des Testsystems) könnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus *in vitro*-Messsystemen erhöhen. Die Kryokonservierung ist deshalb ein wesentlicher Faktor zur Etablierung der Messmethoden, die zur Evaluierung von Umweltchemikalien mit reproduktionstoxischer Wirkung eingesetzt werden sollen. Voraussetzung für den Einsatz eingefrorenen Rindersamens ist jedoch die erhaltene Funktionalität des aufgetauten Spermias. Es gilt also *a priori* Einfriermethoden im Hinblick auf den Einsatz der Samenzellen in den entsprechenden *in vitro*-Modellen zu überprüfen.

Besonderes Augenmerk muss auf die Kompatibilität der Einfriermedien (Verdüner) mit den geplanten Testmethoden gelegt werden. Funktion und Aufgaben der Verdünnungsmedien haben sich im Laufe der Zeit grundlegend verändert. Während bei Frisch-Samen-Medien die nutritiven und konservierenden Eigenschaften dominieren, sind an Einfrier-Medien vornehmlich kryoprotektive Anforderungen zu stellen [128]. Dies ist auch funktionell damit zu begründen, dass direkt nach Verbringen des Inseminates in den *Corpus uteri* eine „Ausverdünnung“ erfolgt und daher das Verdünnungsmedium für die Spermien keinerlei funktionelle oder nutritive Bedeutung mehr besitzt.

Die heutzutage verwendeten Verdünnungsmedien für tiefzugefrierendes Bullensperma lassen sich in zwei Kategorien einordnen: Hühnereidotter oder Milchbestandteile enthaltende Produkte. Gemeinsam haben sie als wesentliche Inhaltsstoffe Schutz- und Hüllsubstanzen tierischer Herkunft. Diese auf tierischen Eiweißen basierende Verdüner sind jedoch in hygienischer und physikalischer Hinsicht relativ anfällig und daher zwangsläufig häufiger belastet als ein sterilisierbares Medium. Ein solches repräsentiert ein Verdüner (AndroMed[®]), dessen Konzeption im wesentlichen auf der Verwendung von Soja-Lecithinen beruht [3]. Ein wesentlicher Faktor, der für einen Verdüner auf Pflanzenbasis spricht, ist, dass in eidotterhaltigen Präparaten mit nicht unerheblichen Konzentrationen lipophiler Substanzen gerechnet werden muss, die sich über die Nahrung der Tiere im Eidotter anreichern können. Samenzellen könnten somit vor dem eigentlichen Experiment mit im Eidotter enthaltenen Umweltschadstoffen in Kontakt kommen und diese aufnehmen.

Ein weiterer Vorteil eines auf Pflanzenbasis aufgebauten Kryoprotektivums besteht darin, dass biochemische Untersuchungen an Spermatozoen erleichtert werden. Tierische Eiweiße aus Hühner-Eidotter und Milchbestandteile haften in der Regel fest an Spermatozoen. Immunologische, proteinchemische und histologische Untersuchungen können

durch kontaminierende tierische Eiweiße zu Missinterpretationen von Ergebnissen führen. Von Substanzen in Sojabohnen-Präparationen ist diese Problematik weniger zu erwarten, bedarf aber einer Überprüfung dieser Annahme.

4.5 Motilitätsmessung mit der Computer-assistierten Spermatozoen-Bewegungsanalyse (CASA)

Zur Analyse der Bewegungsaktivität von Spermatozoen ist ein reproduzierbares und gleichzeitig mit vertretbarem Zeitaufwand durchführbares Verfahren erforderlich. Zu den effektivsten und modernsten Ansätzen gehört die Kombination von Videomikrographie und automatischer Auswertung der Videobildsequenzen mit Hilfe der Computerbildanalyse [91]. Mittlerweile sind diese sogenannten CASA-Systeme weltweit etabliert und werden routinemäßig für die Analyse der Bewegung von Spermatozoen verschiedener Spezies in Klinik und Grundlagenforschung eingesetzt [96, 99]. Der Vorteil des CASA-Systems liegt in der objektiven, reproduzierbaren, schnellen und gut dokumentierbaren Analyse von Spermatozoen-Bewegungsmustern. Auch Motilitätsanalysen bestimmter Spermatozoensubpopulationen, deren typisches Bewegungsmuster nur schwer mit dem Auge zu erfassen sind (z.B. Samenzellen mit einem Hyperaktivierungsmuster), lassen sich in solchen computerunterstützten Bewegungsanalysesystemen durchführen. In den vorliegenden Ergebnissen der Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass der Verdünner AndroMed[®] im Vergleich mit dem konventionellen Tris-Verdünner betreffend der Gesamtmotilität ein um etwa 20% besseres Ergebnis nach Auftauen der kryokonservierten Spermatozoen ergab. Andere Motilitätsparameter wie Hyperaktivierungsmuster, Linear-motilität und Geschwindigkeit zeigten im Vergleich der Verdünner keine wesentlichen qualitativen Unterschiede (nicht gezeigt). Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass das auf Sojalecithin basierende Kryopotektivum AndroMed[®] betreffend der Motilitätsanalyse konventionellen Verdünnern überlegen war.

4.6 Aufbereitung von kryokonservierten bovinen Spermatozoen

Zur quantitativen Aufbereitung von Testzellen aus kryokonservierten Ejakulaten eignen sich zwei Methoden: a) der Einsatz der Filtration von Samenzellen über Glaswollssäule [155] und b) die Swim-up Methode [143]. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass beide Aufbereitungsmethoden in gleichem Maße geeignet waren, bewegliche Spermatozoen quantitativ anzureichern und entsprechende Funktionsanalysen durchzuführen. Da sich die Aufbereitung über das Glaswollverfahren aufwendiger und kostenintensiver als der Einsatz des Swim-up Verfahrens erwies, wurden in den weiteren Untersuchungen durch Swim-up gewonnene Spermatozoen eingesetzt.

4.7 Induktion und Messung der Akrosomreaktion

Zum Nachweis einer abgelaufenen Akrosomreaktion ist eine große Anzahl von Methoden publiziert worden. Hervorzuheben ist, dass für jede Spezies eigens überprüft werden muss, ob eine bestimmte Methode anwendbar ist oder nicht. Eingesetzt werden in der Regel verschiedene Farbstoffe sowie Fluoreszein-markierte Lektine und Antikörper gegen akrosomale Bestandteile.

Im bovinen System haben sich der Dual Stain [55] und die Markierung mit *Pisum sativum*-Agglutinin [45] als besonders aussagekräftig erwiesen. Physiologische Induktoren der Akrosomreaktion im bovinen System sind solubilisierte Zona pellucida-Proteine [65], bovine Follikularflüssigkeit und Progesteron [85].

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch mit AndroMed[®] kryokonservierte Test-Spermatozoen geeignet waren, die Akrosomreaktion zu bestimmen und die Induktion der akrosomalen Exozytose boviner Spermatozoen durch Progesteron und ZP3-6 Peptid qualitativ und quantitativ zu messen. AndroMed[®] zeigte sich hier dem konventionellen Tris-Verdüner sogar deutlich überlegen: Die Bestimmung des akrosomalen Status von Swim-up Spermatozoen wurde durch die Zugabe von Eigelb als Kryoprotektivum deutlich erschwert, wenn nicht sogar unmöglich gemacht, weil die Spermatozoen im Bereich des Kopfes agglutinierten. Dieses Phänomen zeigte sich nicht bei AndroMed[®]-verdünnten Samenzellen. Eine Erklärung für die durch Eigelb hervor-

gerufenen Agglutinationen könnten Proteine, Lektine oder andere Substanzen im Eigelb sein, die über eine Interaktion von Brückenmolekülen das Anheften der Zellen aneinander bedingen.

4.8 Genistein als Testsubstanz für umweltbedingte männliche Infertilität

Genistein ist ein Phytoöstrogen und gehört zur Gruppe der Isoflavone (Abbildung 4.1). Es wirkt über Östrogen-Rezeptoren und wurde auch als Tyrosinkinase-Inhibitor und Natrium-Kanal-Blocker beschrieben [6, 137, 140]. Die molekulare Wirkungsweise des Genisteins, die zur Beeinträchtigung der Fertilität beim Säuger führt, ist noch unklar. In verschiedenen Tiermodellen wurde der Einfluss von Genistein (als Tyrosinkinase-Inhibitor) auf Spermatozonenfunktionen untersucht. Genistein hemmt im Katzenmodell die durch Zona pellucida induzierte Akrosomreaktion, die Eizellbefruchtung und die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen [142]. In Arbeiten über Maus-Spermatozonen wurde beschrieben, dass Genistein die durch Zona pellucida induzierte Akrosomreaktion hemmt [113]. Genistein hat auch einen hemmenden Effekt auf die durch Progesteron induzierte Akrosomreaktion sowie auf die Proteintyrosinphosphorylierung in humanen Spermatozonen [117, 163]. Östrogenartige Effekte des Genisteins auf die Spermatozonenfunktionen können nicht ausgeschlossen werden, da vor kurzem ein membranärer Östrogen-Rezeptor in humanen Spermatozonen charakterisiert wurde, der den Progesteron-Effekt hemmen soll [119].

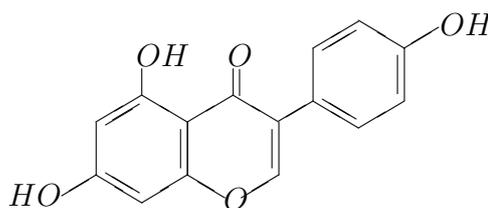


Abbildung 4.1: Struktur von Genistein

In Voruntersuchungen wurde der Effekt von Genistein auf die Spermatozonen-Zona pellucida-Interaktion evaluiert [82, 87]. Mit Hilfe des Hemizona-Assays konnte in einer Reihe von Untersuchungen nachgewiesen werden, dass nach Behandlung boviner Spermatozonen mit Genistein die Bindung der Samenzellen an die Zona pellucida im Vergleich zur Kon-

trolle deutlich erniedrigt war. Zur Sicherstellung, dass die Verminderung der Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida nach Inkubation mit Genistein nicht mit einem zytotoxischen Effekt zu erklären ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Vitalität der Spermatozoen überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass nach Auswertung der Zellvitalitätsfärbung sowohl bei kryokonservierten als auch bei frischen Spermatozoen nach 4-stündiger Inkubation nur eine geringfügige Abnahme der Vitalität sowohl bei Kontroll- als auch bei Testspermatozoen zu beobachten war. Somit konnte gezeigt werden, dass Genistein keinen akuten zytotoxischen Effekt auf bovine Spermatozoen hat. Um den funktionellen Einfluss von Genistein auf die Spermatozoenfunktion zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Veränderungen der Motilität und des Motilitätsmusters Genistein-behandelter boviner Spermatozoen überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass Genistein *in vitro* keinen Einfluss auf die Gesamtmotilität boviner Spermatozoen hat. Auch betreffend der im CASA-System bestimmten Motilitätsmuster (progressive Motilität, lineare Motilität und Hyperaktivität) konnte kein Unterschied zwischen Test- und Kontrollpermatozoen gefunden werden (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen waren sowohl mit frischen Spermatozoen als auch mit kryokonservierten bovinen Samenzellen zu erheben. Zwar zeigte sich eine geringfügige Abnahme der Motilität nach einem Zeitintervall von vier Stunden; im Vergleich zu den mit Genisteininkubierten Samenzellen und Kontrollpermatozoen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Abfall der Motilität kann auf den Energieverbrauch mit der Zeit zurückgeführt werden; Spermatozoen inkorporieren im Vergleich zu somatischen Zellen in nur relativ geringem Ausmaß Energieträger aus dem sie umgebenden Medium. Deshalb sind ihre Energiereserven begrenzt, und die Motilität verringert sich mit der Zeit. Diese Ergebnisse bestätigen Daten, die von Hägele und Mitarbeiter (1998) [82] erhoben wurden; hier zeigte sich, dass Genistein in verschiedenen Konzentrationen keinen Effekt auf die Motilität boviner Spermatozoen hatte.

4.9 Molekulare Basis der Kapazitation

Testikuläre Spermatozoen sind morphologisch voll entwickelt; sie können sich aber noch nicht progressiv bewegen oder eine Eizelle befruchten. In vielen Spezies erlangen die Spermatozoen die progressive Motilität und die Fähigkeit mit einer Eizelle zu intera-

gieren während der Passage durch den Nebenhoden (Epididymis). Die vollständige Befruchtungsfähigkeit erlangt das Spermatozoon während eines sich an die Ejakulation anschließenden Reifungsprozesses, der als Kapazitation bezeichnet wird. Dieser Prozess wurde erstmals von Austin [15, 16] und Chang [40, 41] experimentell nachgewiesen. Die Kapazitation ist ein reversibler Prozess, und 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 [72]. Durch die Inkubation kapazitierter Spermatozoen mit diesem Faktor konnte die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen deutlich reduziert werden [72]. Umgekehrt wurde beschrieben, dass durch sanfte Zentrifugation des DF von der Spermatozoenoberfläche dissoziiert, wodurch wiederum die Befruchtungsfähigkeit verbessert werden kann [50]. Andererseits enthält das Seminalplasma 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 [65]; erst nach einer einstündigen Präinkubation mit Seminalplasma und anschließender Kapazitation kann bei epididymalen Spermatozoen die Akrosomreaktion so ausgelöst werden wie bei ejakulierten Spermatozoen.

In vivo vollzieht sich der Prozess der Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt. Dennoch kann dieser Vorgang in mehreren Spezies auch *in vitro* erreicht werden. Experimentell konnte gezeigt werden, dass Kapazitation auch erfolgen kann, wenn epididymale und/oder ejakulierte Spermatozoen in definierten Medien unter verschiedenen Bedingungen inkubiert werden. Die Dauer der Kapazitation variiert, je nach Spezies, zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden [196]. Die Inkubationsmedien, die für die *in vitro* Kapazitation verwendet werden, ähneln der Elektrolytkomposition der Oviduktflüssigkeit. In den meisten Fällen beinhalten diese Medien Energiesubstrate wie Pyruvat, Laktat und Glucose (je nach Spezies), eine Proteinquelle (üblicherweise Serumalbumin), NaHCO_3 und Ca^{2+} . Wie diese Substanzen auf molekularer Ebene die Kapazitation fördern, ist noch nicht völlig geklärt. Neue Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen führten zur einer Hypothese, die die molekularen Mechanismen des Kapazitationsprozesses erklären könnte [178]. Diese Hypothese ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

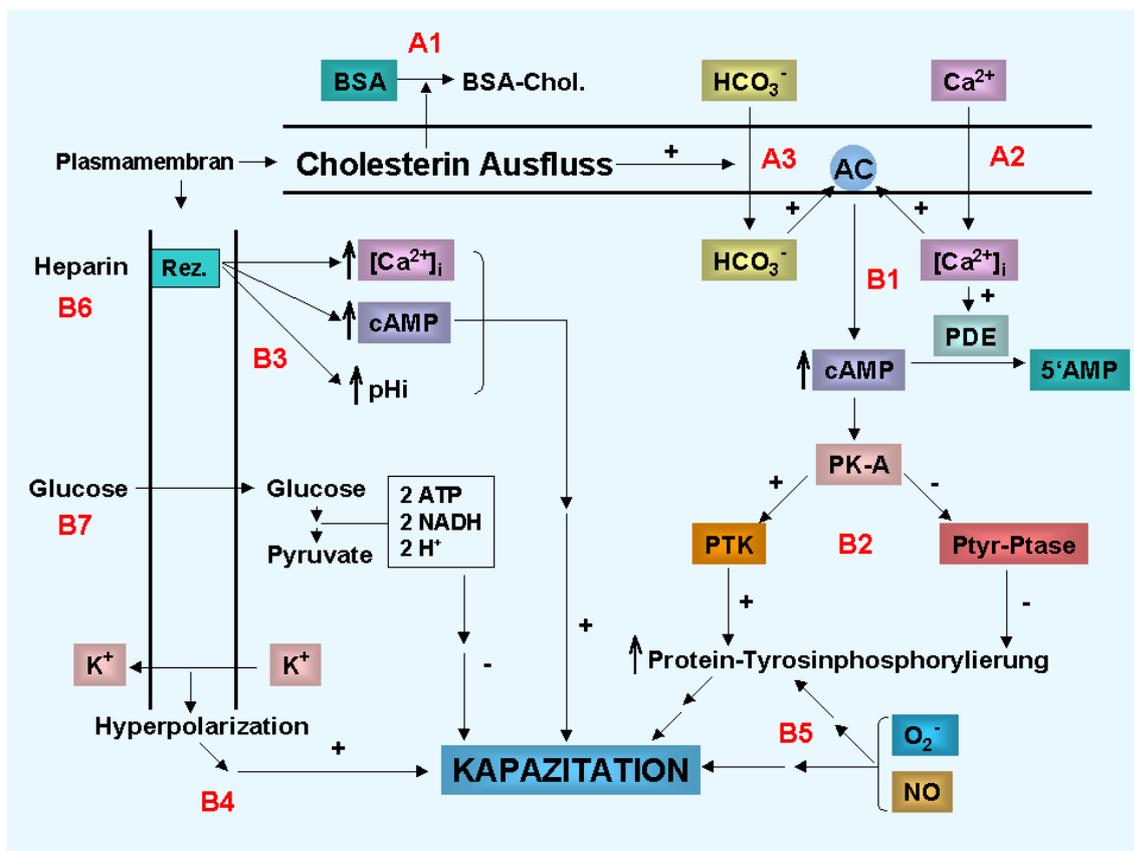


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der transmembranären und intrazellulären Signaltransduktionswege, die wahrscheinlich bei der Kapazitation eine Rolle spielen. Für die Beschreibung der Signaltransduktionswege **A1-B7** siehe Text. Abkürzungen: Chol.=Cholesterin; Rez.=Rezeptor; AC=Adenylylcyclase; PDE=Phosphodiesterase; PKA= Proteinkinase A; PTK=Proteintyrosinkinase; Ptyr-Ptase= Proteintyrosinephosphatase. Modifiziert nach Visconti und Kopf, 1998 [178].

4.9.1 Signaltransduktionsweg A: Rolle von Bestandteilen des Kapazitationsmediums

A1 Serumalbumin. Das Serumalbumin (üblicherweise BSA), das Kapazitationsmedium für Säugerspermatozoen (z.B. Maus-, Hamster-, Rind- oder humanen Spermatozoen) zugegeben wird, soll Cholesterin aus der Spermatozoenplasmamembran entfernen [44, 51, 52, 78, 104]. Der Efflux von Cholesterin und die damit verbundenen Veränderungen der Plasmamembranintegrität (z.B. Veränderungen der Membranfluidität) könnte eine

wesentliche Bedingung für den erfolgreichen Ablauf der Kapazitation sein [192, 193].

A2 Calcium. Die Rolle von Ca^{2+} bei der Initiierung und/oder Regulierung der Kapazitation wird kontrovers diskutiert. Auf welchem Weg eine Zunahme des intrazellulären Calciums während der Kapazitation zustande kommt, ist umstritten [196]. Ein möglicher Calciumeinstrom während der Kapazitation könnte bei Säugerspermatozoen über drei verschiedene Mechanismen reguliert werden:

1. Ca^{2+} -ATPase: Die Ca^{2+} -ATPase kann unter Energieverbrauch Ca^{2+} -Ionen aktiv und gegen einen Gradienten aus der Zelle herausschleusen und wirkt somit der Kapazitation entgegen. Die Hemmung der ATPase kann die Kapazitation beschleunigen [68, 70, 74, 185], während durch die Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase (z.B. durch den DF) die Kapazitation gehemmt wird [1].
2. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschpumpe: Im bovinen System konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ -Austauschmechanismus die Kapazitation negativ beeinflusst [105].
3. Ca^{2+} -Kanäle: Die Rolle von Calcium-Kanälen bei der Kapazitation ist zur Zeit Gegenstand ausführlicher und zum Teil kontroverser Diskussionen. Hier scheinen unterschiedlicher Calcium-Kanal Subtypen in verschiedenen Spezies differente Funktionen innezuhaben, die zur Kapazitation führen. Sicher scheint jedoch zu sein, dass Verschiebungen der intrazellulären Calciumkonzentration einen wesentlichen Teil des Kapazitationsvorganges ausmachen [31].

A3 Bikarbonat. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von HCO_3^- im Medium für die Kapazitation essenziell ist [159]. Der transmembranäre Transport von HCO_3^- Anionen in die Zelle führt zu einer Erhöhung des pH-Wertes, der für die Initiierung der Kapazitation von Bedeutung ist [47, 174, 201]. Eine andere Funktion von Bikarbonat während der Kapazitation könnte die Regulierung des cAMP-Metabolismus sein, da die Adenylylcyclase in Spermatozoen durch HCO_3^- stimuliert wird [77, 131, 180]. Die Spermatozoen-Adenylylcyclase unterscheidet sich wesentlich von Cyclasen somatischer Zellen [42, 194]: Sie ist nicht Plasmamembran-assoziiert sondern in löslicher Form im Zytosol zu finden und kann durch die Erhöhung der intrazellulären HCO_3^- aktiviert werden.

4.9.2 Signaltransduktionsweg B: Effektoren und intrazelluläre „second messengers“

B1 cAMP-Metabolismus. Verschiedene Untersuchungen weisen auf eine Funktion von cAMP als „second messenger“ bei der Regulation der Kapazitation hin [107, 179, 188]. Vor kurzem wurde beschrieben, dass downstream die intrazelluläre cAMP-Konzentration während der Kapazitation zunimmt und dieses zu einer Erhöhung der Proteinkinase A-Aktivität (PKA) führt [177].

B2 pH. Der intrazelluläre pH-Wert ist an der Regulation verschiedener Spermatozoenfunktionen beteiligt. Auch während der Kapazitation wurden Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes in Maus- und Rinderspermatozoen beschrieben [182, 201].

B3 Membranpotenzial. Kapazitation wird von einer Hyperpolarisierung der Spermatozoenmembran begleitet [200]. Die Membranhyperpolarisierung ist initial auf eine verstärkte K^+ -Permeabilität von extrazellulär nach intrazellulär zurückzuführen. Hier spielen noch nicht näher definierte K^+ -Kanäle eine Rolle [200]. Es wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen Hyperpolarisierung während der Kapazitation und der Erzeugung von transienten Ca^{2+} -Erhöhungen der durch physiologische Agonisten (z.B. Zona pellucida oder Progesteron) induzierten Akrosomreaktion diskutiert [12, 115].

B4 Freie Radikale. Freie Radikale haben einen Einfluss auf die Lipidperoxidation in Spermatozoenplasmamembranen [8, 9, 10, 162]. Neuere Arbeiten weisen auf eine Korrelation zwischen Superoxidanion-Generierung und Kapazitation und/oder auf einen Einfluss auf die Hyperaktivierung humaner Spermatozoen hin [54]. Leclerc und Mitarbeiter [108] zeigten, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die Proteintyrosinphosphorylierung mehrerer Proteinen bedingen können. Aitken und Mitarbeiter [5] berichteten über eine Zunahme der Proteintyrosinphosphorylierung nach Stimulation einer endogenen NADPH-Oxidase oder nach Inkubation humaner Spermatozoen mit H_2O_2 .

B5 Proteintyrosinphosphorylierung. Eine Reihe von kürzlich erschienenen Arbeiten haben gezeigt, dass Veränderungen der Proteintyrosinphosphorylierungen zeitlich mit dem Kapazitationsprozess korrelieren [5, 39, 75, 107, 176]. Visconti und Mitarbeiter [176] haben im Maussystem beobachtet, dass während der Kapazitation die Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteinen zunimmt. Diese Veränderungen sind abhängig von der Anwesenheit von BSA-, Ca^{2+} - und HCO_3^- im Kapazitationsmedium [176]. Die Zunahme der Protein-

tyrosinphosphorylierung wird von einem cAMP-abhängigen Signaltransduktionweg unter Beteiligung von PKA in Maus- [176], Rinder- [75], Human- [107, 133], Eber- [90] und Hamster-Spermatozoen [181] moduliert. Galantino-Homer und Mitarbeiter (1997) [75] konnten zeigen, dass auch in bovinen Spermatozoen Proteintyrosinphosphorylierung und Kapazitation in einem engen zeitlichen und kausalen Zusammenhang stehen [75]. In dieser Arbeit wurde außerdem der Zusatz von Heparin und Glucose in das Kapazitationsmedium untersucht. Heparin induziert *in vitro* die Kapazitation (Abbildung 4.2, B6). Dieses Phänomen könnte mit dem physiologischen Vorkommen von Heparin-ähnlichen Glucosaminoglycanen in der bovinen Eileiterflüssigkeit zu erklären sein. Glucosaminoglycane binden an die Spermatozoenoberfläche und könnten möglicherweise adherente Seminalplasmaproteine verdrängen, die eine Kapazitation verhindern oder verzögern [124, 166]. Die Zugabe von Heparin kann auch die Erhöhung des „second messengers“ cAMP bedingen [139], den pH_i erhöhen und die Kapazitation-assoziierte Veränderung des Proteintyrosinphosphorylierungsmusters regulieren [75].

Die Rolle von Glucose (Abbildung 4.2, B7) während der Kapazitation wird kontrovers diskutiert. Hier können spezies-spezifische Unterschiede von Bedeutung sein. In bovinen Spermatozoen hemmt Glucose die durch Heparin-induzierte Kapazitation; der Mechanismus umfasst Effekte auf den cAMP-Metabolismus sowie eine Abnahme des intrazellulären pH_i [139, 174]. Glucose hat auch einen hemmenden Effekt auf die durch Heparin-induzierte Proteintyrosinphosphorylierung [75]. In anderen Spezies, z.B. in humanen Spermatozoen, wurde beobachtet, dass sich die Zugabe von Glucose in das Kapazitationsmedium als kapazitationsfördernd erwies [73, 120, 144, 189].

Die im Rahmen der hier vorgelegten Dissertation erhobenen Ergebnisse konnten die bisher publizierten Daten in anderen Spezies im wesentlichen auch für das Rindersystem bestätigen. In Abhängigkeit von den eingesetzten Medien und deren Zusätze wie Heparin, dbcAMP und IBMX, wurden Veränderungen der Proteintyrosinphosphorylierung über die Zeit überprüft. Unterschiede in der Proteintyrosinphosphorylierung konnten in frischem Ejakulat beim Einsatz von TALP-Medium und HAM F10 festgestellt werden. Wurden bovinen Spermatozoen in HAM F10 kapazitiert, konnten keine Veränderungen des Tyrosinphosphorylierungsmusters beobachtet werden. Nach Einsatz von TALP-Medium konnte unter Zusatz von Heparin, dbcAMP und IBMX die in der Literatur beschriebene Zunahme der Phosphorylierung über die Zeit gesehen werden. Ohne den

Zusatz kapazitationsförender Substanzen trat die Zunahme der Phosphorylierung verspätet ein. Die Behandlung von Spermatozoen mit Genistein hatte keinen wesentlichen Effekt auf das Phosphorylierungsmuster während der Kapazitation.

Eine Erklärung dafür, dass HAM F10 die mit der Kapazitation verbundenen Tyrosinphosphorylierung beeinträchtigt, könnte mit der diesem Medium zugesetzten Glucose zusammenhängen. Galantino-Homer *et al.* (1997) [75] konnten in ejakulierten bovinen Spermatozoen zeigen, dass die Zugabe von Heparin, dbcAMP und IBMX im Kapazitationsmedium den negativen Effekt von Glucose auf die Tyrosinphosphorylierung aufheben kann. Die hier vorgestellten Ergebnisse konnten diese Arbeit nicht bestätigen. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung zu erwähnen, dass auch in HAM F10-Medium kapazitierte Spermatozoen unter Zusatz von physiologischen Induktoren eine Akrosomreaktion erfolgreich durchlaufen konnten (siehe Seite 84). Hier ergibt sich die Frage, inwieweit die Tyrosinphosphorylierung für eine erfolgreiche Kapazitation, deren Endpunkt die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion darstellt, essenziell ist. Die Bedeutung dieser Ergebnisse muss jedoch relativiert werden, weil die Veränderungen in der Tyrosinphosphorylierung nur grob beurteilt wurde und geringgradige Unterschiede im Muster der tyrosinphosphorylierten Proteine nicht erfasst wurden.

Wurden kryokonservierten Spermatozoen im TALP- oder HAM F10-Medium kapazitiert, konnten Unterschiede im Vergleich zum Einsatz frischer Spermatozoen festgestellt werden. Wurden aufgetaute Spermatozoen im TALP-Medium und ohne den Zusatz von Heparin, dbcAMP und IBMX kapazitiert, kam es zu keiner Veränderung des Tyrosinphosphorylierungsmusters während unter Zusatz dieser Substanzen eine Zunahme der Phosphorylierung zu beobachten war. Des Weiteren konnte im Gegensatz zu frischen Samenzellen bei Spermatozoen, die in HAM F10 mit dem entsprechenden kapazitationsförenden Substanzen kapazitiert wurden, eine Zunahme der Phosphorylierung beobachten werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der Kryokonservierungsprozess in Spermatozoen zu Veränderungen führt, die den negativen Effekt von Glucose auf die Kapazitationsfähigkeit aufzuheben scheinen. Eine Erklärung hierfür könnten Veränderungen der Membranintegrität nach Einfrieren und Auftauen der Zellen sein. Eine weitere Möglichkeit wäre ein kapazitationsförender Effekt der zugesetzten Kryoprotektiva. Von Bedeutung ist es auch hervorzuheben, dass der Zusatz von Heparin, dbcAMP und IBMX im Gegensatz zu frischen Ejakulaten bei kryokonservierten Spermatozoen unabdinglich

für eine erfolgreiche Kapazitation ist. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass nach Kryokonservierung für die Kapazitation wichtige Substanzen wie cAMP fehlen und direkt (durch dbcAMP) oder indirekt (durch Heparin, IBMX) ersetzt werden müssen. Weder in TALP- noch in HAM F10-Medium kapazitierten Spermatozoen konnte ein Effekt von Genistein auf die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen nachgewiesen werden. Mit diesem Ergebnis konnten die Befunde, die an frischen Ejakulate erhoben wurden, bestätigt werden.

4.10 Funktionelle Tests zur Untersuchung der Kapazitation

Aufgrund des unvollständigen Wissens über die molekularen Mechanismen, die zur Kapazitation eines Spermatozoons führen, sind Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Kapazitation eher deskriptiv als molekular und funktionell definiert. Da die Kapazitation ein Prozess ist, der zur akrosomalen Exozytose des Spermatozoons führt, ist die Bestimmung der akrosomalen Reaktion der einzige funktionelle Indikator, der eine erfolgreich abgeschlossene Kapazitation eines Spermatozoons beschreibt. Eine Methode, die deskriptiv-morphologisch eine abgelaufene Kapazitation widerspiegelt, ist der Chlortetracyclin-Fluoreszenz-Assay.

4.10.1 Chlortetracyclin-Fluoreszenz-Analyse

Das Antibiotikum Chlortetracyclin (CTC) ist eine fluoreszierende Chemikalie, die sich nach Inkubation mit Samenzellen vorwiegend im Spermatozoenkopf anreichert und je nach kapazitations- und akrosomalem Status verschiedene, gut abgrenzbare Fluoreszenz-Muster erzeugt. Diese CTC-Bindungsmuster wurden zum ersten Mal in der Maus von Saling und Storey (1979) [154] beschrieben. Die Korrelation zwischen CTC-Mustern und dem Status der Kapazitation wurde in späteren Arbeiten von Ward und Storey (1984) näher definiert [186]. Diese Bindungsmuster konnten auch für die Bewertung der Kapazitation auf andere Spezies, z.B. auf bovine Spermatozoen, [71, 110] übertragen werden. Die Verteilungsmuster von CTC in anderen Spezies unterscheiden sich aber deutlich von denen der Maus [71, 110]. Der Vorteil dieser Methode ist, dass der Kapazitationsstatus der Spermatozoen unabhängig von der Akrosomreaktion beurteilt werden kann. Allerdings konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, aufgrund welcher morphologischen Verän-

derungen während der Kapazitation CTC die verschiedenen Fluoreszenz-Muster im Spermatozoonkopf erzeugt. Daher sind die physiologischen/molekularen Ereignisse der Kapazitation, die mit der Bildung dieser Muster zusammenhängen, im wesentlichen unbekannt. Die Veränderungen in der Verteilung von Ca^{2+} -CTC-Komplexen, die an Phospholipiden der Plasmamembran gebunden sind, könnten für die verschiedenen Fluoreszenz-Muster verantwortlich sein. Substanzen, die das Fluoreszenzabsorptionsspektrum von CTC oder Ca^{2+} -Phospholipid-Komplexen verändern oder die Fluoreszenzintensität abschwächen, können allerdings die Interpretation der Ergebnisse verfälschen.

In dieser Arbeit wurde der CTC-Assay eingesetzt, um abzuklären, ob Genistein einen Effekt auf Veränderungen der durch CTC erfassten Fluoreszenz-Muster, die Indikatoren für die Kapazitation sind, hat. Mit diesem Testsystem sollte überprüft werden, ob in kryokonservierten Spermatozoen die Tyrosinphosphorylierung und die durch CTC nachgewiesene Kapazitation in einem kausalen Zusammenhang stehen. Nach einer Kapazitation von vier Stunden wurde wie in der Literatur beschrieben [69], eine Verringerung des Prozentsatzes nicht-kapazitierter Spermatozoen (F-Muster) und zeitgleich die Zunahme kapazitierter Spermatozoen (B-Muster) beobachtet. Auch mit diesem validen Testsystem zur Bestimmung der Kapazitation konnte Genistein kein Effekt auf die Kapazitation zugeschrieben werden, denn es zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle keine statistisch signifikante Unterschiede in der prozentualen Verteilung der F- und B-Muster boviner Spermatozoen. Diese Untersuchungen wurden mit kryokonservierten Spermatozoen und HAM F10 (ohne Zusatz kapazitationsfördender Substanzen) als Kapazitationsmedium durchgeführt. Während bei der Tyrosinphosphorylierung keine Unterschiede in der Intensität der Phosphorylierung oder im Muster zu beobachten waren, konnte durch den CTC-Assay die erfolgreiche Kapazitation von bovinen Spermatozoen unter diesen Kapazitationsbedingungen beobachtet werden. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Veränderungen der Proteintyrosinphosphorylierung nicht notwendigerweise Indikatoren für die Kapazitation von Spermatozoen sind.

Es fand sich allerdings nach vier Stunden eine statistisch signifikante Zunahme des prozentualen Anteils spontan akrosomreagerter Spermatozoen in der Kontrolle. Während in Genistein-behandelten Spermatozoen eine Zunahme zu beobachten war, wurde dies als nicht statistisch signifikant bewertet. Da jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Genistein-behandelten Spermatozoen festzustellen war, ist das Fehlen des

signifikanten Anstiegs spontan akrosomreagierter Spermatozoen nach Genistein Behandlung unbedeutend.

4.10.2 Akrosomreaktion

Die akrosomale Reaktion ist der Endpunkt eines obligatorischen Reifungsprozesses des Spermatozoons; als Konsequenz kommt es zur Durchdringung der Zona pellucida und zur Fusion der Gameten [196]. Bei der Akrosomreaktion in Säugerspermatozoen (Abbildung 4.3) kommt es zuerst zu einem partiellen Verschmelzen der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran. Es bilden sich aus beiden Membranteilen Hybridvesikel. Dadurch kommt es zu einer Fenestrierung des Akrosoms durch die der akrosomale Inhalt austreten kann. Im weiteren Verlauf löst sich die äußere akrosomale Membran einschließlich der ihr anliegenden Plasmamembran vom Akrosom. Nach Abschluss der Akrosomreaktion liegt dann die innere akrosomale Membran frei über dem vorderen Anteil des Zellkerns. Nur im Bereich des äquatorialen Segmentes können sich noch Reste des akrosomalen Inhaltes befinden (Abbildung 4.3).

Progesteron-induzierte Akrosomreaktion

Bevor die Spermatozoen die Eizelle erreichen, kommen sie mit Eileiter- und Follikelflüssigkeit in Kontakt. Untersuchungen mit diesen Sekreten haben gezeigt, dass beide die Akrosomreaktion *in vitro* induzieren können. Die Eizelle wird von einer Schicht von Cumulus-Zellen (Cumulus oophorus) umgeben, die reich an Hyaluronsäure ist. Der Cumulus oophorus besteht aus zwei unterschiedlichen Strukturen: der äußeren Zellschicht/-masse (Cumulus-Zellen) und der inneren Schicht (Corona radiata). Es konnte gezeigt werden, dass der Cumulus oophorus Steroide [106, 134] und Proteine [165] produziert, die einen Einfluss auf physiologische Funktionen von Spermatozoen haben können.

Ob auch *in vivo* die von den Cumulus-Zellen produzierten Substanzen die Spermatozoenfunktion modulieren, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Hypothese ist, dass Spermatozoen während der Passage durch den Cumulus den Endpunkt des Kapazitationsprozesses erreichen [165]. Hier könnte das Hormon Progesteron, das in relativ hohen Konzentrationen die Akrosomreaktion von Säugerspermatozoen induzieren kann [95], eine wesentliche Rolle spielen. Dieses Hormon wird von den Cumulus-Zellen während der Ovulation produziert und erreicht regionale Konzentrationen von 5-10 μ M [134]. Die Effekte

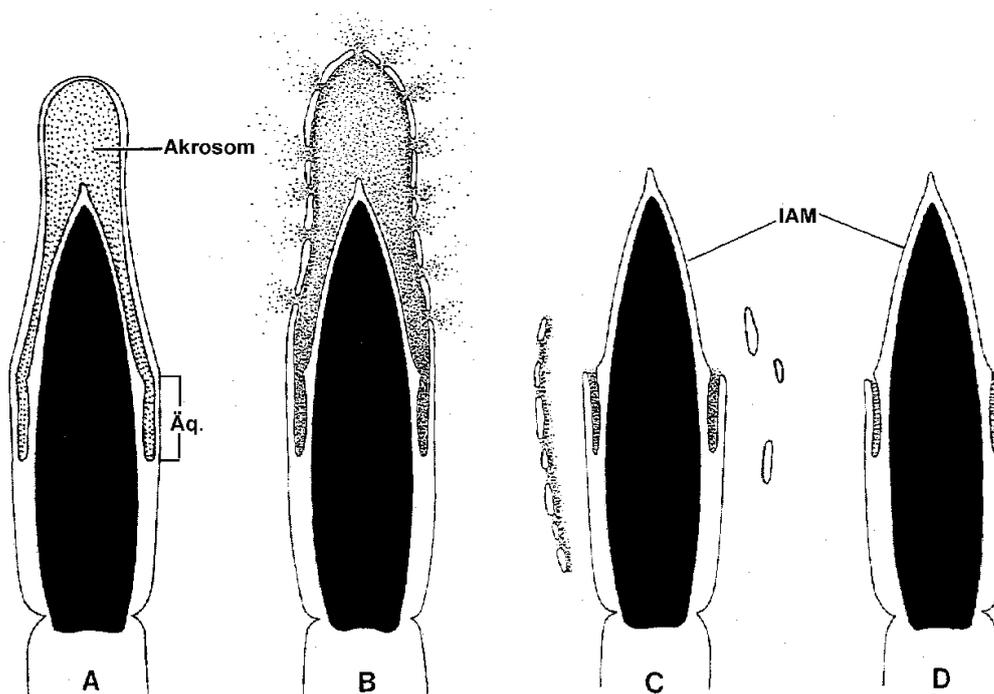


Abbildung 4.3: Schematischer Ablauf der Akrosomreaktion im Säugerspermatozoen. **(A)** Spermatozoenkopf mit intaktem Akrosom. **(B)** Partielle Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran, die sogenannte Fenestrierung beginnt. **(C-D)** Vollständige Ablösung der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran mit Resten akrosomalen Inhaltes im Bereich der Umschlagfalte. Äq.: äquatoriales Segment; IAM: innere akrosomale Membran. Modifiziert nach Yanagimachi, 1994 [196].

von Progesteron auf die Spermatozoen beruhen auf einem schnellen Ca^{2+} -Einstrom, und der Effekt scheint von nicht-genomischer Natur zu sein. Luconi und Mitarbeiter [118] haben einen Progesteron-Rezeptor in der humanen Spermatozoenplasmamembran beschrieben, aber noch nicht endgültig charakterisiert und identifiziert. Die durch Progesteron-induzierte Akrosomreaktion kann durch Pertussis-Toxin nicht gehemmt werden; dieses legt die Vermutung nahe, dass die transmembranäre Signaltransduktion nicht durch ein Pertussis-Toxin-sensitives G-Protein moduliert wird [164]. In verschiedenen Säugetier-spezies, einschließlich des Menschen, wurden weitere Substanzen identifiziert, die einen Einfluss auf die akrosomale Exozytose haben können. Es handelt sich hier um Prostaglandine, Sterolsulfate, Glucosaminoglycane und Östrogene, die in der Follikelflüssigkeit und im Cumulus-Zell-Sekret nachgewiesen werden konnten [84, 111, 199]. In einer vor kurzem erschienenen Arbeit konnten Östrogen-Rezeptoren in humanen Spermato-

zoen nachgewiesen werden [119]. Funktionell konnte gezeigt werden, dass Östrogene den Ca^{2+} -Einstrom induzieren und die Progesteron-induzierte Akrosomreaktion modulieren [21, 119]. Es gibt Hinweise dafür, dass Östrogene einen Ca^{2+} -Einstrom über die direkte Regulierung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen hervorrufen [62].

ZP3-induzierte Akrosomreaktion

Die akrosomale Exozytose ist verbunden mit der Freisetzung proteolytischer akrosomaler Enzyme und wird durch Anlagerung des Spermatozoons an die Zona pellucida induziert [27, 152]. Die Zona pellucida ist eine extrazelluläre, durchscheinende Glykoprotein-Hülle, die die Eizelle vollständig umgibt [196]. Je nach Spezies besteht die Zona pellucida aus zwei bis fünf Glykoproteinen unterschiedlicher Molekularmassen. Im am besten untersuchten Modell, der Maus, werden die unterschiedlichen Glykoproteine Zona pellucida-Protein 1 (ZP1), Zona pellucida-Protein 2 (ZP2) und Zona pellucida-Protein 3 (ZP3) genannt [196].

In der Literatur werden drei mögliche Modelle für die Spermatozoon-Zona pellucida-Interaktion diskutiert: a) eine Protein-Protein-Interaktion, in der das ZP3 Protein an einen Rezeptor in der Plasmamembran des Spermatozoons bindet, b) eine Protein-Kohlenhydrat-Interaktion, in der bestimmte Kohlenhydratketten der Zona pellucida mit Rezeptor-Proteinen in der Spermatozoenplasmamembran interagieren und c) eine Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktion [32]. Als entscheidende Moleküle für die Induktion der Akrosomreaktion werden auf Seite der Eizelle das ZP3-Protein [28] und auf Seite der Spermatozoen noch unzureichend identifizierte Rezeptor-Proteine diskutiert. Es wurden mehrere ZP3-Rezeptor-Proteine in Spermatozoenmembranen beschrieben, die die Spermatozoen-Bindung an die Zona pellucida und/oder die akrosomale Reaktion modulieren könnten [35, 113, 153, 171]. Bisher war es allerdings nicht möglich, den G-Protein-regulierten ZP3-Rezeptor eindeutig zu identifizieren.

Die durch die Zona pellucida induzierte Akrosomreaktion ist Calcium- und Chlorid-abhängig [69, 122, 197] und wird dabei durch ein Pertussis-Toxin-sensitives G-Protein (wahrscheinlich G_i) moduliert [60, 101, 187].

Das im Akrosom enthaltene Akrosin/Proakrosin soll im weiteren für die sekundäre Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida (mit ZP2 als Zona pellucida Bindungsprotein) verantwortlich sein [88, 152, 175] und ermöglicht zusammen mit den anderen pro-

teolytischen Enzymen dem Spermatozoen das Durchdringen der Zona pellucida [33, 126].

Molekulare Basis der Akrosomreaktion

Die molekularen Mechanismen, die die Akrosomreaktion regulieren, erscheinen sehr komplex. Eine Vielzahl von Publikationen befasst sich mit unterschiedlichen Signaltransduktionswegen, die möglicherweise netzartig miteinander verbunden sind. Auch spezies-spezifische Unterschiede scheinen eine einheitliche Sichtweise der molekularen Abläufe der Akrosomreaktion zu erschweren.

Wie in Abbildung 4.4 dargestellt und zusammengefasst, werden bei der Akrosomreaktion Calcium-, cAMP-, Kinase- und Redox-abhängigen Signaltransduktionswege aktiviert (Abbildung 4.4).

Calcium-abhängiger Signaltransduktionsweg. In Maus-Spermatozoen wurde eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration während der durch Zona pellucida-Proteine induzierte Akrosomreaktion beobachtet; dies beruht auf der Aktivierung von spannungs-abhängigen Ca^{2+} -Kanäle (VOCC) des T-Typs [13, 48]. Die Beteiligung von VOCCs bei der durch Progesteron-induzierten Akrosomreaktion in humanen Spermatozoen wird kontrovers diskutiert [20, 25, 26, 76, 97]. Verschiedene Arbeiten weisen auf die Beteiligung von Ca^{2+} -Speichern hin [58, 135, 184], jedoch ist ihre Rolle in der Spermatozoenphysiologie umstritten. Kürzlich wurden speicher-gesteuerte Ca^{2+} -Einstrom-Mechanismen nachgewiesen, die bei dem durch Zona pellucida-induzierten Ca^{2+} -Einstrom und der damit verbundenen Akrosomreaktion involviert sein könnten [135]. Dennoch sind die Natur und die Lokalisation dieser Speicher unbekannt und *in vitro* durchgeführte Untersuchungen sind grundsätzlich artefaktanfällig.

cAMP-abhängiger Signaltransduktionsweg. Die Beteiligung von cAMP bei der durch Zona pellucida- und Progesteron-induzierten Akrosomreaktion wurde in Spermatozoen verschiedener Spezies nachgewiesen [109, 138]. Durch die Inhibition von Proteinkinase A, eine Serin-Threonin-Kinase, die in diesem Signaltransduktionsweg aktiviert wird, kann die Akrosomreaktion gehemmt werden [24]. Die Rolle des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges bei der Akrosomreaktion ist noch nicht vollständig geklärt [145].

Phospholipase-Aktivierung. Die Stimulation kapazitierter Spermatozoen mit Progesteron oder Zona pellucida führt zur Aktivierung der Calcium-abhängigen Phospholipase C und somit zum Anstieg der intrazellulären Konzentration der „second messenger“ Inositol-

Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) [145]. In somatischen Zellen fördert IP_3 die Freisetzung von Ca^{2+} aus Ca^{2+} -Speichern. Da das Vorkommen von Ca^{2+} -Speichern in Spermatozoen noch nicht eindeutig nachgewiesen wurde, ist die physiologische Bedeutung von IP_3 umstritten. DAG ist der physiologische Aktivator der Proteinkinase C (PKC). Das Vorkommen von PKC-Aktivität in Spermatozoen wurde gezeigt (siehe unten).

Auch eine Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2) während der Akrosomreaktion wurde auch beschrieben [145]. Insbesondere soll die Aktivierung der PLA2 nach Induktion der Spermatozoen mit Progesteron zur Produktion von Arachidonsäure, Lysophosphatidylcholin [18, 146] und „platelet-activating factor“ [18] führen.

Beteiligung von Cl^- -Kanälen. Ein neuronaler Glycin-Rezeptor/ Cl^- -Kanal (GlyR) wurde in Spermatozoenplasmamembran identifiziert. Es gibt Hinweise dafür, dass GlyR bei der durch Zona pellucida-hervorgerufenen initialen Vorgänge eine Rolle spielen [116]. Agonisten des GlyRs können Dosis-abhängig die Akrosomreaktion induzieren [116, 122, 173]. Die Aktivierung der Kanäle könnte zu einem Cl^- -Efflux aus der Samenzelle und somit zur Hyperpolarisierung führen; dabei könnten dann VOCCs aktiviert werden [76].

Weiterhin wurde veröffentlicht, dass beim Progesteron-induzierten Ca^{2+} -Einstrom ein γ -Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptor/ Cl^- -Kanal involviert sein könnte, denn GABA induziert in Dosis-abhängiger Weise die Akrosomreaktion humaner Spermatozoen [37, 191]. Es konnte gezeigt werden, dass während der durch Progesteron-induzierten Akrosomreaktion ein Cl^- -Efflux stattfindet [172]. Ähnlich wie bei dem Zona pellucida/GlyR-System könnte die sich daraus ergebende Hyperpolarisierung der Spermatozoenmembran die VOCCs aktivieren. Es gibt auch Hinweise dafür, dass die Aktivierung von GABA-Rezeptoren eine Zunahme der Aktivität des Natrium/Bikarbonat-Kotransporters hervorrufen kann, die zu einer Erhöhung der intrazellulären HCO_3^- -Konzentration führt [172].

Kinase-abhängige Signaltransduktionswege. Die Inkubation von Spermatozoen mit Zona pellucida oder Progesteron führt zu einer Zunahme der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine [36, 117], und die Inhibition der Tyrosinkinasen hemmt die durch den Agonisten-induzierte Akrosomreaktion [36, 117]. Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass die Aktivierung von Tyrosinkinasen in Zusammenhang mit den Progesteron- und Zona pellucida-induzierten Ca^{2+} -Einstrom steht [17, 30, 163].

Schließlich wird auch die Beteiligung einer Serin/Threonin-Phosphorylierungskaskade

während der Akrosomreaktion diskutiert. Neben PKA wurde auch PKC in Spermatozoen nachgewiesen [129]. Diese Enzyme scheinen in der Regulation der Akrosomreaktion über die Phosphorylierung von Proteinen involviert zu sein [24,29]; funktionell kann die Induktion der Akrosomreaktion durch Inhibitoren von PKA und PKC gehemmt werden [53].

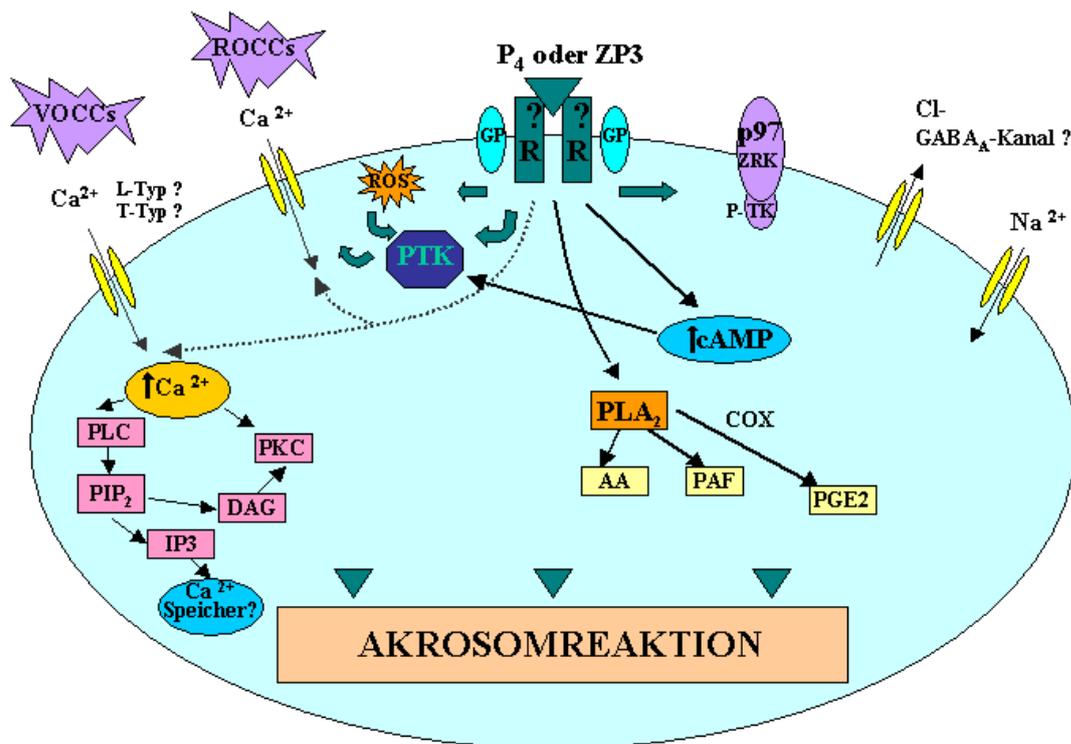


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Akrosomreaktion auf molekularer Basis. AA: Arachidonsäure; DAG: Diacylglycerol; GP: G-Protein; IP₃: Inositol-Triphosphat; P: Progesteron; PAF: platelet-activating factor; PGE₂: Prostaglandin E₂; PIP₂: Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat; PKC: Proteinkinase C; PLA₂: Phospholipase A₂; PLC: Phospholipase C; PTK: Proteintyrosinkinase; R: Rezeptor; ROCCs: Rezeptor-gesteuerte Calcium-Kanäle; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies; TK: Tyrosinkinase; VOCCs: Spannungsabhängige Calcium-Kanäle; ZP3: Zona pellucida 3-Protein; ZRK: Zona pellucida-Rezeptor-Kinase. Modifiziert nach Baldi, 2002 [19].

Induktion der Akrosomreaktion in vitro

Obwohl die Kapazitation als *conditio sine qua non* für die Befruchtungsfähigkeit eines Spermatozoons angesehen wird, kann auch die Akrosomreaktion (z.B. als Antwort auf

die Zona pellucida oder Progesteron) als ein früherer Endpunkt des Reifungsprozesses angesehen werden [64, 196]. Diese Definition wird von der Annahme getragen, dass nur kapazitierte Spermatozoen in der Lage sind, die Akrosomreaktion durchzuführen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass weder epididymale noch ejakulierte Spermatozoen die Fähigkeit besitzen, die Akrosomreaktion als Antwort auf physiologische Induktoren wie die Zona pellucida oder Progesteron durchzuführen [159, 176, 186, 196]. Physiologische Induktoren können die Akrosomreaktion nur dann induzieren, wenn die Spermatozoen kapazitiert sind [64]. Auf der Zeitaxe liegt die Akrosomreaktion zwischen der Kapazitation und der Befruchtung; daher ist die Anwendung von Tests für den Nachweis der Akrosomreaktion vorteilhaft. Darüber hinaus ist die Bestimmung des akrosomalen Status einfacher durchzuführen. Die Untersuchung des Einflusses verschiedener, nicht physiologischer Chemikalien auf die Akrosomreaktion stellt sich jedoch als problematisch dar. Chemikalien, die die Akrosomreaktion induzieren oder hemmen, erreichen diese Wirkung in der Regel nicht durch eine Modifikation des Kapazitationsprozesses. Die physiologische Bedeutung dieser Substanzen (z.B. Ca^{2+} -Ionophor), die die Kapazitation umgehen können, ist fraglich. In diesem Fall kann die Akrosomreaktion in unkapazitierten Spermatozoen stattfinden. Die Aussagekraft dieser „Induktoren“ für die Aufklärung physiologischer oder pathophysiologischer Fragestellungen ist deshalb sehr beschränkt.

In der Untersuchungen zur Kapazitation boviner Spermatozoen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Genistein den Kapazitationsprozess nicht beeinflusst. Aus diesem Grund wurde in einer Reihe von Experimenten überprüft, ob Genistein einen direkten und kapazitationsunabhängigen Effekt auf die Akrosomreaktion hat. Sowohl in frischen Spermatozoen als auch in kryokonservierten Samenzellen konnte gezeigt werden, dass Genistein einen hemmenden Einfluss auf die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion hat. Dieses gilt sowohl für die Progesteron- als auch für die ZP3-6 Peptid-induzierte Akrosomreaktion. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich: 1) Genistein hemmt die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion zweier physiologischen Induktoren mit unterschiedlichen Signaltransduktionswegen und 2) Genistein hemmt die Akrosomreaktion auf einem Kapazitationsunabhängigen Signaltransduktionsweg. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Genistein seine Wirkung entweder „up-stream“ (auf Rezeptor-Ebene) der G-Proteinen-regulierten Signaltransduktionskaskade oder „down-stream“ (z.B. Ionen-Kanäle, intrazelluläre Calcium-Konzentration) über einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg entfal-

tet. Die Hypothese, dass Genistein die Calcium-Homöostase von Spermatozoen beeinflusst, wird durch mehrere Publikationen unterstützt [30, 163]. Es ist allerdings ergänzend festzustellen, dass die in diesen Arbeitsgruppen durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass Genistein nicht die durch Calcium-Fluxe-regulierte Kapazitation beeinträchtigt sondern offensichtlich Calcium-abhängige Abläufe der akrosomalen Exozytose beeinflusst. In Vorarbeiten konnten Hägele *et al.* [82] zeigen, dass Genistein beim Rind die Spermatozoen-Zona pellucida-Interaktion negativ beeinflusst. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse schließen Effekte von Genistein auf den Kapazitationvorgang aus. In der Literatur wurde beschrieben, dass z.B. bei der Katze Genistein die Bindung von Spermatozoen an und das Durchdringen durch die Zona pellucida hemmt. Diese funktionelle Beeinträchtigung wurde in Verbindung gebracht mit einer Verminderung der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion [142]. Eine Rolle sollte die verstärkte Tyrosinphosphorylierung zweier Proteinen in Spermatozoen spielen [142]. Die in der Dissertationsarbeit vorgestellten Ergebnisse weisen auf einen ähnlichen Effekt des Genisteins auf die bovine Spermatozoenfunktion hin. Veränderungen in der Tyrosinphosphorylierung in Genistein-behandelten Spermatozoen während der Kapazitation wurden nicht beobachtet. Es bedarf jetzt weitergehender Untersuchungen, um nachzuweisen, ob Genistein einen negativen Einfluss auf die Phosphorylierung von Proteinen hat, die nach der Kapazitation und direkt bei der Regulation der akrosomalen Exozytose von Bedeutung sind.

5 Zusammenfassung

Unfruchtbarkeit bei Mensch und Tier wird zunehmend der Belastung der Natur durch Schadstoffe zugeschrieben. Neben den vom Menschen in die Umwelt eingebrachten Chemikalien wird auch die alimentäre Aufnahme pflanzlicher Produkte diskutiert, die einen Einfluss auf die Fertilität haben können. Genistein gehört zur Gruppe der Phytoöstrogene deren Struktur denen von endogenen Östrogenen in Mensch und Tier ähnelt. Diese Wirkstoffe konnten ubiquitär in der Pflanzenwelt, wie z. B. in Sojabohnen oder Hopfen nachgewiesen werden. Ziel der Arbeit war es mit Genistein als Modellsubstanz ein valides und reproduzierbares *in vitro* Testsystem für den Nachweis negativer Einflüsse von Umweltsubstanzen auf die Spermatozoenfunktion einzusetzen und die molekularen Mechanismen zu evaluieren, mit denen Genistein die Funktion von Samenzellen beeinflusst. Als Testzellen wurden Rinderejakulate verwendet, die unter Zusatz des Verdünners AndroMed[®] eingefroren wurden; AndroMed[®] enthält im Gegensatz zu konventionellen Kryoprotektiva kein tierisches Eiweiß (i. d. R. Hühnereigelb). Es konnte gezeigt werden, dass AndroMed[®]-kryokonservierte bovine Spermatozoen als Testzellen für die Bestimmung von Spermatozoenfunktionen geeignet sind. Für sämtliche essenziellen Spermatozoenfunktionen konnten valide und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Somit wurden biochemische Untersuchungen erleichtert bzw. erst ermöglicht, weil keine im Einfriermedium befindlichen tierischen Eiweiße die Werte verfälschten. Es ist bekannt, dass Genistein die Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida hemmt. In der Arbeit konnte jetzt gezeigt werden, dass Genistein *in vitro* weder einen zytotoxischen Effekt auf Rinderspermatozoen ausübt, noch die Beweglichkeit der Samenzellen beeinflusst. Auch verändert Genistein das Tyrosinphosphorylierungsmuster von Spermatozoenproteinen während der Kapazitation nicht wesentlich. Die Wahl der Zellkulturmedien und kapazitationsfördernden Zusätze hatte einen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung. Beim Vergleich von eingefrorenen und frischen Samenzellen fanden sich abhängig vom Kapazitationsmedium Unterschiede im Phosphorylierungsmuster. Im Chlortetracyclin-Assay konnte gefunden werden, dass Genistein die Kapazitation von Spermatozoen nicht beeinflusst. Allerdings wurde bei den Untersuchungen zur Induzierbarkeit der Akrosomreaktion mit physiologischen Induktoren festgestellt, dass Genistein die mit Progesteron- oder ZP3-6 Peptid-induzierte akrosomale Exozytose hemmt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit AndroMed[®] kryokonservierte Test-Spermatozoen dazu geeignet sind nachzuweisen, dass die hemmende Wirkung des Phytoöstrogens Genistein auf die Spermatozoen-Zona pellucida Interaktion nicht auf eine Beeinträchtigung der Vitalität, Motilität oder der Protein-Tyrosinphosphorylierung während der Kapazitation zurückzuführen ist, sondern einen direkten Effekt auf Signaltransduktionsmechanismen hat, die an der Akrosomreaktion beteiligt sind.

6 Abstract

It has been suspected that certain synthetic chemicals and natural plant products may affect fertility adversely. These substances have been associated with reproductive problems in wildlife and in humans. Genistein, a phytoestrogen, belongs to a group of natural isoflavones present in e.g. soybean and hops. It has been identified in human and animal biological fluids and is present in foodstuffs. The objective of this study was to establish a valid and reproducible in vitro test system with genistein as a test substance to evaluate the effects of environmental compounds on sperm functions and to evaluate which molecular mechanisms in spermatozoa are affected by this compound. Bovine spermatozoa cryopreserved with AndroMed[®] were used as test cells. In contrast to standard diluents, AndroMed[®] contains no proteins of animal origin such as egg yolk proteins. The results show that AndroMed[®]-cryopreserved bovine spermatozoa are suitable test cells for the analysis of sperm functions. Reproducible results were obtained for all sperm functions tested. It is known that genistein can block the binding of spermatozoa to the zona pellucida. In the present study, it was demonstrated that genistein in vitro has neither cytotoxic effects on bovine spermatozoa nor effects on sperm motility. In addition, the incubation of spermatozoa with genistein does not appreciably alter tyrosine phosphorylation of proteins during capacitation. The choice of medium and additives to promote capacitation was found to have an influence on protein tyrosine phosphorylation. Comparing cryopreserved and fresh spermatozoa differences in tyrosine phosphorylation were observed, when different capacitation media were applied. Using the chlortetracycline assay, it was shown that genistein has no effect on sperm capacitation. However, in assessing of the inducibility of the acrosome reaction with physiological inducers, it was determined that genistein inhibits progesterone- and ZP3-6 peptide-induced acrosomal exocytosis. In summary, we found that AndroMed[®]-cryopreserved sperm preparations are suitable for testing the effects of the phytoestrogen genistein. Furthermore, the inhibitory effect of genistein on the spermatozoa-zona pellucida interaction is not due to impairment of vitality, motility, or protein tyrosine phosphorylation, but rather to a direct effect on the signal transduction mechanisms involved in the acrosome reaction.

Literaturverzeichnis

- [1] Adeoya-Osiguwa, SA; Fraser, LR: Evidence for Ca²⁺-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. *Mol Reprod Dev* (1996) 44: 111–120
- [2] Adlercreutz, H; Mazur, W: Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann Med* (1997) 29: 95–120
- [3] Aires, VA; Hinsch, E; Mueller-Schloesser, F; Bogner, K; Mueller-Schloesser, S; Hinsch, K-D: *Functional parameters and insemination success of bovine semen cryopreserved in egg yolk or soy bean-lecithin based extenders*. 2002. – submitted
- [4] Aitken, RJ; Harkiss, D; Knox, W; Paterson, M; Irvine, DS: A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci* (1998) 111: 645–656
- [5] Aitken, RJ; Paterson, M; Fisher, H; Buckingham, DW; Van Duin, M: Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* (1995) 108: 2017–2025
- [6] Akiyama, T; Ishida, J; Nakagawa, S; Ogawara, H; Watanabe, S; Itoh, N; Shibuya, M; Fukami, Y: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* (1987) 262: 5592–5595
- [7] Alabi, NS; Whanger, PD; Wu, AS: Interactive effects of organic and inorganic selenium with cadmium and mercury on spermatozoal oxygen consumption and motility in vitro. *Biol Reprod* (1985) 33: 911–919
- [8] Alvarez, JG; Storey, BS: Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod* (1982) 27: 1102–1108
- [9] Alvarez, JG; Storey, BS: Taurine, hypotaurine, epinephrine, and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biol Reprod* (1983) 29: 548–555

- [10] Alvarez, JG; Storey, BS: Assessment of cell damage caused by lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biol Reprod* (1984) 30: 323–331
- [11] Arai, Y; Mori, T; Suzuki, Y; Bern, H A.: Long-term effects of perinatal exposure to sex steroids and diethylstilbestrol on the reproductive system of mammals. *Int Rev Cytol* (1983) 84: 235–68
- [12] Arnoult, C; Kazam, IG; Visconti, PE; Kopf, GS; Villaz, M; Florman, HM: Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96: 6757–6762
- [13] Arnoult, C; Villaz, M; Florman, HM: Pharmacological properties of the T-type Ca^{2+} current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol* (1998) 53: 1104–1111
- [14] Auger, J; Kunstmann, JM; Czyglik, F; Jouannet, P: Decline in semen quality among fertile men in Paris during the last 20 years. *The New England J Med* (1995) 332: 281–285
- [15] Austin, CR: Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* (1951) 4: 581–596
- [16] Austin, CR: Capacitation of spermatozoa. *Int J Fertil* (1967) 12: 25–31
- [17] Bailey, JL; Storey, BT: 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-quinuclidinyl benzilate. *Mol Reprod Dev* (1994) 39: 297–308
- [18] Baldi, E; Falsetti, C; Krausz, C; Gervasi, G; Carloni, V; Casano, R; Forti, G: Stimulation of platelet-activating factor synthesis by progesterone and A23187 in human spermatozoa. *Biochem J* (1993) 292: 209–216
- [19] Baldi, E; Luconi, M; Bonaccorsi, L; Forti, G: Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol* (2002) 53: 121–131
- [20] Baldi, E; Luconi, M; Bonaccorsi, L; Maggi, M; Francavilla, S; Gabriele, A; Properzi, G; Forti, G: Nongenomic progesterone receptor on human spermatozoa: biochemical aspects and clinical implications. *Steroids* (1999) 64: 143–148

- [21] Baldi, E; Luconi, M; Muratori, M; Forti, G: A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Mol Cell Endocrinol* (2000) 161: 31–35
- [22] Bannwart, C; Adlercreutz, H; Wahala, K; Kotiaho, T; Hesso, A; Brunow, G; Hase, T: Identification of the phyto-oestrogen 3',7-dihydroxyisoflavan, an isomer of equol, in human urine and cow's milk. *Biomed Environ Mass Spectrom* (1988) 17: 1–6
- [23] Baukloh, V; Bohnet, H G.; Trapp, M; Heeschen, W; Feichtinger, W; Kemeter, P: Biocides in human follicular fluid. *Ann N Y Acad* (1985) 442: 240–250
- [24] Bielfeld, P; Faridi, A; Zaneveld, LJ; DeJonge, CJ: The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases. *Fertil Steril* (1994) 61: 536–541
- [25] Blackmore, PF; Eisoldt, S: The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activates T-type calcium channels in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* (1999) 5: 498–506
- [26] Blackmore, PF; Neulen, J; Lattanzio, F; Beebe, SJ: Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* (1991) 266: 18655–18659
- [27] Bleil, JD; Wassarman, PM: Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* (1980) 20: 873–882
- [28] Bleil, JD; Wassarman, PM: Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* (1983) 95: 317–324
- [29] Bonaccorsi, L; Krausz, C; Pecchioli, P; Forti, G; Baldi, E: Progesterone-stimulated intracellular calcium increase in human spermatozoa is protein kinase C-independent. *Mol Hum Reprod* (1998) 4: 259–268
- [30] Bonaccorsi, L; Luconi, M; Forti, G; Baldi, E: Tyrosine kinase inhibition reduces the plateau phase of the calcium increase in response to progesterone in human sperm. *FEBS Lett* (1995) 364: 83–86
- [31] Breitbart, H: Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* (2002) 187: 139–144

- [32] Brewis, IA; Wong, CH: Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Reviews of Reproduction* (1999) 4: 135–142
- [33] Brown, CR; Cheng, WTK: Limited proteolysis of the porcine zona pellucida by homologous sperm acrosin. *J Reprod Fertil* (1992) 74: 257–260
- [34] Burkman, LJ: Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. Gagnon, C (Hrsg.): *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 1990, 303–329
- [35] Burkman, LJ; Coddington, CC; Franken, DR; Kruger, TF; Rosenwaks, Z; GD, Hodgen: The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* (1988) 49: 668–697
- [36] Burks, DJ; Carballada, R; Moore, HDM; Saling, PM: Interaction of a tyrosine kinase from human sperm interacts with the zona pellucida at fertilization. *Science* (1995) 269: 83–86
- [37] Calogero, AE; Burrello, N; Ferrara, E; Hall, J; Fishel, S; D'Agata, R: Gamma-aminobutyric acid (GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone. *Fertil Steril* (1999) 71: 930–936
- [38] Carlsen, E; Giwercman, A; Keiding, N; Skakkebaek, NE: Evidence for the decreasing quality of semen during the past 50 years. *Brit Med J* (1992) 305: 609–613
- [39] Carrera, A; Moos, J; Ning, XP; Gerton, GL; Tesarik, J; Kopf, GS; Moss, SB: Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* (1996) 180: 284–296
- [40] Chang, MC: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* (1951) 168: 697–698
- [41] Chang, MC: Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature* (1955) 175: 1036–1037
- [42] Chen, Y; Cann, MJ; Litvin, TN; Iourgenko, V; Sinclair, ML; Levin, LR; Buck, J: Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* (2000) 289: 625–628

- [43] Colborn, T; Clement, C: *Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*. Princeton, New Jersey: Princeton Scientific Publishing Co., 1992
- [44] Cross, NL: Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* (1998) 59: 7–11
- [45] Cross, NL; Meizel, S: Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* (1989) 41: 635–641
- [46] Cross, NL; Overstreet, JW: Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. *Gamete Res* (1987) 16: 23–25
- [47] Cross, NL; Razy-Faulkner, P: Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod* (1997) 56: 1169–1174
- [48] Darszon, A; Labarca, P; Nishigaki, T; Espinosa, F: Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* (1999) 79: 481–510
- [49] DasGupta, S; Mills, CL; Fraser, LR: Ca²⁺-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* (1993) 99: 135–143
- [50] DasGupta, S; Mills, CL; Fraser, LR: A possible role for Ca²⁺-ATPase in human sperm capacitation. *J Reprod Fertil* (1994) 102: 107–116
- [51] Davis, BK: Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) 78: 7560–7564
- [52] Davis, BK; Byrne, R; Hangund, B: Studies on the mechanism of capacitation II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* (1979) 558: 257–266
- [53] De Jonge, CJ; Barratt, CL; Radwanska, E; Cooke, ID: The acrosome reaction-inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J Androl* (1993) 14: 359–365
- [54] de Lamirande, E; Gagnon, C: A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* (1993) 16: 21–25

- [55] Didion, BA; Dobrinsky, JR; Giles, JR; Graves, CN: Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* (1989) 22: 51–57
- [56] Doherty, CM; Tarchala, SM; Radwanska, E; De Jonge, CJ: Characterization of two second messenger pathways and their interactions in eliciting the human sperm acrosome reaction. *J Androl* (1995) 16: 36–46
- [57] Dougherty, RC; Piotrowska, K: Screening by negative chemical ionization mass spectrometry for environmental contamination with toxic residues: application to human urines. *Proc Natl Acad Sci USA* (1976) 73: 1777–1781
- [58] Dragileva, E; Rubinstein, S; Breitbart, H: Intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod* (1999) 61: 1226–1234
- [59] Eddy, EM; O'Brien, DA: The spermatozoon. Knobil, E; Neill, JD (Hrsg.): *The Physiology of Reproduction*. Second Edition. New York: Raven Press, Ltd., 1994, 29–78
- [60] Endo, Y; Lee, MA; Kopf, GS: Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction. *Dev Biol* (1987) 119: 210–216
- [61] Ensslen, SC; Riedel, HH; Bluthgen, H; Heeschen, W: Chlorkohlenwasserstoff in Seminalplasma und männliche Fertilität. *Zentralbl Gynäkol* (1990) 112: 817–821
- [62] Espinosa, F; Lopez-Gonzalez, I; Munoz-Garay, C; Felix, R; DelaVega-Beltran, JL; Kopf, GS; Visconti, PE; Darszon, A: Dual regulation of the T-type Ca^{2+} current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett* (2000) 475: 251–256
- [63] Fawcett, DW: The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* (1975) 44: 394–436
- [64] Florman, HM; Babcock, DF: Progress towards understanding the molecular basis of capacitation. Wassarman, P (Hrsg.): *Elements of Mammalian Fertilization* Bd. I. Basic Concepts. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1991, 105–132
- [65] Florman, HM; First, NL: The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev Biol* (1988) 128: 453–463

- [66] Foote, RH; Gray, LC; Young, DC; HO, Dunn: Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20% egg yolk extenders. *J Dairy Sci* (1960) 43: 1330–1337
- [67] Franken, DR; Coddington, CC; Burkman, LJ; Oosthuizen, WT; Oehninger, SC; Kruger, TF; Hodgen, GD: Defining the valid hemizona assay: accounting for binding variability within zonae pellucidae and within semen samples from fertile males. *Fertil Steril* (1991) 56: 1156–1161
- [68] Fraser, LR: Na⁺ requirements for capacitation and acrosomal exocytosis in mammalian sperm. *Int Rev Cytol* (1994) 149: 1–46
- [69] Fraser, LR: Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. *Human Reprod* (1995) 19: 22–30
- [70] Fraser, LR: Ionic control of sperm function. *Reprod Fertil Dev* (1995) 7: 905–925
- [71] Fraser, LR; Abeydeera, LR; K, Niwa: Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* (1995) 40: 233–241
- [72] Fraser, LR; Harrison, RA; Herod, JE: Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* (1990) 89: 135–148
- [73] Fraser, LR; Herod, JE: Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *J Reprod Fertil* (1990) 88: 611–621
- [74] Fraser, LR; McDermott, CA: Ca²⁺-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca²⁺-ATPase. *J Reprod Fertil* (1992) 96: 363–377
- [75] Galantino-Homer, HL; Visconti, PE; Kopf, GS: Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* (1998) 56: 707–719
- [76] Garcia, MA; Meizel, S: Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biol Reprod* (1999) 60: 102–109
- [77] Garty, N; Salomon, Y: Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett* (1987) 218: 148–152

- [78] Go, KJ; Wolf, DP: Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* (1985) 32: 145–153
- [79] Guillette, LJ J.; Gross, TS; Masson, GR; Matter, JM; Percival, HF; Woodward, AR: Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentration in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* (1994) 102: 680–688
- [80] Gundersen, GG; Shapiro, BM: Sperm surface proteins persist after fertilization. *J Cell Biol* (1984) 99: 1343–1353
- [81] Gürtler, H; Hoffmann, B: Vorkommen von Phyto- und Mykoöstrogenen in Futtermitteln und ihre Bedeutung für die Reproduktion landwirtschaftlicher Nutztiere und die Qualität von Lebensmitteln tierischer Herkunft. *Endokrinologie Information* (1996) 20: 126–131
- [82] Hägele, W; Hinsch, E; Müller-Schlösser, F; Brummer, A; Schill, W-B; Hinsch, K-D: Einfluß des Phytoöstrogens Genistein auf die Spermatozoenfunktion. *Tierärztl Umschau* (1998) 53: 437–441
- [83] Harrison, RAP: Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* (1996) 8: 581–594
- [84] Hartshorne, GM: Steroid production by the cumulus: relationship to fertilization in vitro. *Hum Reprod* (1989) 4: 742–745
- [85] Hinsch, E; Hinsch, K-D; 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* (1997) 32: 143–149
- [86] Hinsch, E; Ponce, AA; Hagele, W; Hedrich, F; Muller-Schlosser, F; Schill WB, Hinsch K.: A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. *Hum Reprod* (1997) 12: 1673–1681
- [87] Hinsch, KD; Aires, V; Hagele, W; Hinsch, E: In vitro tests for essential sperm functions using the phyto-oestrogen genistein as a test substance. *Andrologia* (2000) 32: 225–231
- [88] 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* (1995) 39: 501–510

- [89] Jouannet, P; Wang, C; Eustache, F; Kold-Jensen, T; Auger, J: Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS* (2001) 109: 333–344
- [90] Kalab, P; Peknicova, J; Geussova, G; Moos, J: Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* (1998) 51: 304–314
- [91] Katz, DF; Davis, RO: Automatic analysis of human sperm motion. *J Androl* (1987) 8: 170–181
- [92] Kaufman, PB; Duke, JA; Brielmann, H; Boik, J; Hoyt, JE: A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *J Altern Complement Med* (1997) 3: 7–12
- [93] Keck, C; Bramkamp, G; Behre, M-H; Müller, C; Jockenhovel, F; Nieschlag, F: Lack of correlation between cadmium in seminal plasma and fertility status of nonexposed individuals and two cadmium-exposed patients. *Reprod Toxicol* (1995) 9: 35–40
- [94] Kemp, RB; Cross, DM; Meredith, RW: Comparison of cell death and adenosine triphosphate content as indicators of acute toxicity in vitro. *Xenobiotica* (1988) 18: 633–639
- [95] Kirkman-Brown, JC; Punt, EL; Barratt, CL; Publicover, SJ: Zona pellucida and progesterone-induced Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* (2002) 23: 306–315
- [96] Knuth, UA; Yeung, CH; Nieschlag, E: Computerized semen analysis: objective measurement of semen characteristics is biased by subjective parameter setting. *Fertil Steril* (1987) 48: 118–124
- [97] Kobori, H; Miyazaki, S; Kuwabara, Y: Characterization of intracellular Ca^{2+} increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* (2000) 63: 113–120
- [98] Köhn, FM; Schuppe, HC; Schill, WB; Jeyendran, RS: Hydrogen hexachloroplatinate induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Int J Androl* (1995) 18: 321–325
- [99] Kolossa, M; Seibert, H: A chemically-„defined“ diluent for cryopreservation of bovine spermatozoa. *Andrologia* (1990) 22: 445–454

- [100] Kopf, GS; Visconti, PE; Moos, J; Galantino-Homer, HL; Ning, XP: Integration of tyrosine kinase and G protein-mediated signal transduction pathways in the regulation of mammalian sperm function. Fénichel, P; Parinaud, J (Hrsg.): *Human Sperm Acrosome Reaction* Bd. 236. Montrouge: John Libbey Eurotext Ltd., 1995, 191–216
- [101] Kopf, GS; Woolkalis, MJ; Gerton, GL: 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* (1986) 261: 7327–7331
- [102] Laemmli, UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* (1970) 227: 680–685
- [103] Lamartiniere, CA; Moore, JB; Brown, NM; Thompson, R; Hardin, MJ; Barnes, S: Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 11 (1995): 2833–2840
- [104] Langlais, J; Roberts, KD: A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* (1985) 12: 183–224
- [105] Lardy, H; San Agustin, J: *Caltrin and calcium regulation of sperm activity*. New York: Academic Press, 1989, 29–39
- [106] Laufer, N; DeCherney, AH; Haseltine, FP; Behrman, HR: Steroid secretion by the human egg-corona-cumulus complex in culture. *J Clin Endocrinol Metab* (1984) 58: 1153–1157
- [107] Leclerc, P; de Lamirande, E; Gagnon, C: Cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* (1996) 55: 684–692
- [108] Leclerc, P; de Lamirande, E; Gagnon, C: Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radical Biol Med* (1997) 22: 643–656
- [109] Leclerc, P; Kopf, GS: Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biol Reprod* (1995) 52: 1227–1233
- [110] Lee, MA; Trucco, GS; Bechtol, KB; Wummer, N; Kopf, GS; Blasco, L; Storey, BT: Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* (1987) 48: 649–658

- [111] Lenz, RW; Ball, GD; Lohse, JK; First, NL; Ax, RL: Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biol Reprod* (1983) 28: 683–690
- [112] Lerchl, A; Nieschlag, E: Decreasing sperm counts? A critical (re)view. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (1996) 104: 301–307
- [113] Leyton, L; LeGuen, P; Bunch, D; Saling, PM: Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89: 11692–11695
- [114] Leyton, L; Saling, P: 95 kDa sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* (1989) 57: 1123–1130
- [115] Linares-Hernandez, L; Guzman-Grenfell, AM; Hicks-Gomez, JJ; Gonzalez-Martinez, MT: Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1372: 1–12
- [116] Llanos, MN; Ronco, AM; Aguirre, MC; Meizel, S: Hamster sperm glycine receptor: evidence for its presence and involvement in the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* (2001) 58: 205–215
- [117] Luconi, M; Bonaccorsi, L; Krausz, C; Gervasi, G; Forti, G; Baldi, E: Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* (1995) 108: 35–42
- [118] Luconi, M; Bonaccorsi, L; Maggi, M; Pecchioli, P; Krausz, C; Forti, G; Baldi, E: Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J Clin Endocrinol Metab* (1998) 83: 877–885
- [119] Luconi, M; Muratori, M; Forti, G; Baldi, E: Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84: 1670–1678
- [120] Mahadevan, MM; Miller, MM; Moutos, DM: Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro. *Hum Reprod* (1997) 12: 119–123
- [121] Meizel, S; Turner, KO; Nuccitelli, R: Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol* (1997) 182: 67–75

- [122] Melendrez, CS; Meizel, S: Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl⁻ channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biol Reprod* (1995) 53: 676–683
- [123] Miller, DJ; Macek, MB; Shur, BD: Complementarity between sperm surface β -1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* (1992) 357: 589–593
- [124] Miller, DJ; Winer, MA; Ax, RL: Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* (1990) 42: 899–915
- [125] Moore, HDM: Modification of sperm membrane antigens during capacitation. Fénichel, P; Parinaud, J (Hrsg.): *Human Sperm Acrosome Reaction* Bd. 236. Montrouge: John Libbey Eurotext Ltd., 1995, 35–43
- [126] Morales, P; Llanos, M: Role of the acrosome reaction in egg vestments and plasma membrane penetration. Fénichel, P; Parinaud, J (Hrsg.): *Human Sperm Acrosome Reaction* Bd. 236. Montrouge: John Libbey Eurotext Ltd., 1995, 133–149
- [127] Mortimer, ST: A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* (1997) 3: 403–439
- [128] Müller-Schlösser, F; Hinsch, E; Böhm, J; Schill, W B.; Hinsch, K D.: Untersuchung an einem eidotterfreien Verdünnungsmedium für Tiergefrier-Konservierung von Bullensperma. *Tierärztl Prax* (1995) 23: 501–505
- [129] Naor, Z; Breitbart, H: Protein kinase C and mammalian spermatozoa acrosome reaction. *Trends Endocrinol Metab* (1997) 8: 337–342
- [130] Naz, RK: Protein tyrosine phosphorylation and signal transduction during capacitation-acrosome reaction and zona pellucida binding in human sperm. *Arch Androl* (1996) 37: 47–55
- [131] Okamura, N; Tajima, Y; Soejima, A; Masuda, H; Sugita, Y: Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through the direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* (1985) 260: 9699–9705
- [132] Oko, R: Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol Reprod* (1988) 39: 168–182

- [133] Osheroff, JE; Visconti, PE; Valenzuela, JP; Travis, AJ; Alvarez, J; Kopf, GS: Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* (1999) 5: 1017–1026
- [134] Osman, RA; Andria, ML; Jones, AD; Meizel, S: Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* (1989) 160: 828–833
- [135] O´Toole, CM; Arnoult, C; Darszon, A; Steinhardt, RA; Florman, HM: Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* (2000) 11: 1571–1584
- [136] Pagliacci, MC; Smacchia, M; Migliorati, G; Grignani, F; Riccardi, C; Nicoletti, I: Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer* (1994) 30A: 1675–1682
- [137] Paillart, C; Carlier, E; Guedin, D; Dargent, B; Couraud, F: Direct block of voltage-sensitive sodium channels by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* (1997) 280: 521–526
- [138] Parinaud, J; Milhet, P: Progesterone induces Ca⁺⁺-dependent 3´,5´-cyclic adenosine monophosphate increase in human sperm. *J Clin Endocrinol Metab* (1996) 81: 1357–1360
- [139] Parrish, JJ; Susko-Parrish, JL; Uguz, C; First, NL: Differences in the role cyclic adenosine 3´,5´-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol Reprod* (1994) 51: 1099–1108
- [140] Peterson, G: Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr* (1995) 125: 784S–789S
- [141] Pilikian, S; Guerin, JF: Acrosome-reaction capacity of frozen-thawed human semen: relation to hamster ova penetration. *Arch Androl* (1986) 16: 209–214
- [142] Pukazhenthil, BS; Wildt, DE; Ottinger, MA; Howard, J: Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. *Mol Reprod Dev* (1998) 49: 48–57
- [143] Rodriguez-Martinez, H; Larsson, B; Pertoft, H: Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev* (1997) 9: 297–308

- [144] Rogers, BJ; Perreault, SD: Importance of glycolysable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* (1990) 43: 1064–1069
- [145] Roldan, ER: Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Front Biosci* (1998) 3: d1109–d1119
- [146] Roldan, ER; Fragio, C: Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J Biol Chem* (1993) 268: 13962–13970
- [147] Roldan, ER; Murase, T; Shi, QX: Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* (1994) 266: 1578–1581
- [148] Rosenberger, G: *Die klinische Untersuchung des Rindes*. Berlin : Blackwell, 1990
- [149] Rüsse, I; Sinowatz, F: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Berlin/Hamburg: Parcy, 1991. 18–32 S
- [150] Saaranen, M; Kantola, M; Saarikoski, S; Vanha-Perttula, T: Human seminal plasma cadmium: comparison with fertility and smoking habits. *Andrologia* (1989) 21: 140–145
- [151] Saidi, JA; Chang, DT; Goluboff, ET; Bagiella, E; Olsen, G; Fisch, H: Declining sperm counts in the United States? A critical review. *J Urol* (1999) 161: 460–462
- [152] Saling, PM: Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf Rev Reprod Biol* (1989) 11: 339–388
- [153] Saling, PM: How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies. *Biol Reprod* (1991) 44: 246–251
- [154] Saling, PM; Storey, BT: Mouse gamete interactions during fertilization in vitro: chlortetracycline as fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol* (1979) 83: 544–555
- [155] Sanchez, R; Concha, M; Ichikawa, T; Henkel, R; Schill, WB: Glass wool filtration reduces reactive oxygen species by elimination of leukocytes in oligozoospermic patients with leukocytospermia. *J Assist Reprod Genet* (1996) 13: 489–494
- [156] Santell, RC; Chang, YC; Nair, MG; Helferich, WG: Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr* (1997) 127: 263–269

- [157] Seibert, H; Kolossa, M; Wassermann, O: Bovine spermatozoa as an in vitro model for studies on the cytotoxicity of chemicals: effects of chlorophenols. *Cell Biol Toxicol* (1989) 5: 315–330
- [158] Seibert, H; Kolossa, M; Wrangler, R: Mammalian spermatozoa as in vitro model for studies on acute cytotoxicity of chemicals. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* (1986) 332: R 19
- [159] Shi, QX; Roldan, ERS: Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis but is essential for capacitation. *Biol Reprod* (1995) 52: 540–546
- [160] Shutt, DA: Interaction of genistein with oestradiol in the reproductive tract of the ovariectomized mouse. *J Endocrinol* (1967) 37: 231–232
- [161] Stillman, RJ: In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring. *Am J Obstet Gynecol* (1982) 142: 905–921
- [162] Storey, BS: Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* (1997) 3: 203–213
- [163] Tesarik, J; Carreras, A; Mendoza, C: Single cell analysis of tyrosine kinase dependent and independent Ca²⁺ fluxes in progesterone induced acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* (1996) 2: 225–232
- [164] Tesarik, J; Moos, J; Mendoza, C: Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* (1993) 133: 328–335
- [165] Tesarik, J; Pilka, L; Drahorad, J; Cechova, D; Veselsky, L: The role of cumulus cell-secreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability: implication in IVF. *Hum Reprod* (1988) 3: 129–132
- [166] Thérien, I; Bleau, G; Manjunath, P: Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* (1995) 52: 1372–1379
- [167] Tomes, CN; Carballada, R; Moses, DF; Katz, DF; Saling, PM: Treatment of human spermatozoa with seminal plasma inhibits protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* (1998) 4: 17–25

- [168] Toth, GP; Stober, JA; Read, EJ; Zenick, H; Smith, MK: The automated analysis of rat sperm motility following subchronic epichlorohydrin administration: methodologic and statistical considerations. *J Androl* (1989) 10: 401–415
- [169] Towbin, H; Staehelin, T; Gordon, J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 76: 4350–4354
- [170] Tullner, WW: Ureotopic action of the insecticide methoxychlor. *Science* (1961) 133: 647–648
- [171] Tulsiani, DR; Abou-Haila, A: Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments. *Zygote* (2001) 9: 51–69
- [172] Turner, KO; Meizel, S: Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 213: 774–780
- [173] Turner, KO; Syvanen, M; Meizel, S: The human acrosome reaction is highly sensitive to inhibition by cyclodiene insecticides. *J Androl* (1997) 18: 571–575
- [174] Uguz, C; Vredenburg, WL; Parrish, JJ: Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate. *Biol Reprod* 51 (1994),: 1031–1039
- [175] Urch, UA: Biochemistry and function of acrosin. Wassarman, P (Hrsg.): *Elements of Mammalian Fertilization* Bd. I. Basic Concepts. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1991, 233–248
- [176] Visconti, PE; Bailey, JL; Moore, GD; Pan, D; Olds-Clarke, P; Kopf, GS: Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* (1995) 121: 1129–1137
- [177] Visconti, PE; Johnson, L; Oyaski, M; Fornés, M; Moss, SB; Gerton, GL; Kopf, GS: Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* (1997) 192: 351–363
- [178] Visconti, PE; Kopf, GS: Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* (1998) 59: 1–6

- [179] Visconti, PE; Moore, GD; Bailey, JL; Leclerc, P; Connors, SA; Pan, D; Olds-Clarke, P; Kopf, GS: Capacitation of mouse spermatozoa II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* (1995) 121: 1139–1150
- [180] Visconti, PE; Muschietti, JP; Flawia, MM; Tezon, JG: Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* (1990) 1054: 231–236
- [181] Visconti, PE; Stewart-Savage, J; Blasco, A; Battaglia, L; Miranda, P; Kopf, GS; Tezon, JG: Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* (1999) 61: 76–84
- [182] Vredenburg-Wilberg, WL; Parrish, JJ: Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev* (1995) 40: 490–502
- [183] Wagner, U; Schebusch, H; VanderVen, H; Krebs, D: Pestizide in Follikelflüssigkeit und Semiplasma. *Arch Gynec Obstet* (1989) 245: 1039–1040
- [184] Walensky, LD; Snyder, SH: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* (1995) 130: 857–869
- [185] Wang, WH; Abeydeera, LR; Fraser, LR; 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* (1995) 104: 305–313
- [186] Ward, CR; Storey, BT: Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* (1984) 104: 287–296
- [187] Ward, CR; Storey, BT; Kopf, GS: Selective activation of G_i1 and G_i2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem* (1994) 269: 13254–13258
- [188] White, DR; Aitken, RJ: Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* (1989) 22: 163–177
- [189] Williams, AC; Ford, WC: The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J Androl* (2001) 22: 680–695

- [190] Windt, ML; Menkefeld, R; Krüger, TF: *Spermatozoa separation*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1990, 85–89
- [191] Wistrom, CA; Meizel, S: Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/ Cl^- channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* (1993) 15: 679–690
- [192] Wolf, DE; Cardullo, RA: *Physiological properties of the mammalian sperm plasma membrane*. New York: Raven Press, 1991, 599–604
- [193] Wolf, DE; Hagopian, SS; Ishigima, S: Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J Cell Biol* (1986) 102: 1372–1377
- [194] Wuttke, MS; Buck, J; Levin, LR: Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase. *J Pancreas* (2001) 2: 154–158
- [195] Xu, B; Chia, SE; Ong, CN: Concentrations of cadmium, lead, selenium, and zinc in human blood and seminal plasma. *Biol Trace Elem Res* (1994) 40: 49–57
- [196] Yanagimachi, R: *Mammalian fertilization*. Second Edition. New York: Raven Press, 1994, 189–317
- [197] Yanagimachi, R; Usui, N: Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* (1974) 89: 161–174
- [198] Young, RJ; Bodt, BA; Iturralde, TG; Starke, WC: Automated analysis of rabbit sperm motility and the effect of chemicals on sperm motion parameters. *Mol Reprod Dev* (1992) 33: 347–356
- [199] Zaneveld, LJ; DeJonge, CJ; Anderson, RA; Mack, SR: Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* (1991) 6: 1265–1274
- [200] Zeng, Y; Clark, EN; Florman, HM: Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* (1995) 171: 554–563
- [201] Zeng, Y; Oberdorf, JA; Florman, HM: pH regulation in mouse sperm. Identification of Na^+ , and Cl^- and HCO_3^- dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their role in sperm capacitation. *Dev Biol* (1996) 173: 510–520

A Anhang

A.1 Danksagung

Viele Menschen sind dafür verantwortlich, dass ich meine Doktorarbeit in Deutschland angefangen und erfolgreich beendet habe. Hiermit möchte ich mich bei allen herzlich bedanken:

Herr Dr. Ponce, mein ehemaliger Betreuer in Argentinien, knüpfte die Kontakte zu Wissenschaftler in Gießen. Er half mir bei meinen ersten Schritte in der Wissenschaft und gab mir genug Selbstvertrauen, um mich für ein DAAD-Stipendium zu bewerben.

Herr Prof. Dr. Dr. Schill akzeptierte meine Bewerbung und gab mir die Möglichkeit bei Herrn und Frau Dr. Hinsch zu arbeiten.

Herr PD Dr. Hinsch und Frau PD Dr. Hinsch gaben mir nicht nur das Thema dieser Arbeit, sondern auch die Möglichkeit mich weiter zu entwickeln. Sie haben meine Arbeit betreut, meine Fragen beantwortet, mit mir interessante wissenschaftliche Diskussionen geführt und vor allem mir die Chance gegeben, auf Kongressen bekannte Wissenschaftler kennen zu lernen. Eine angenehmere und produktivere Zusammenarbeit kann man sich als Doktorand wohl kaum wünschen.

Herr Dr. Müller-Schlösser von der Besamungsstation Gießen stellte mir die bovinen Ejakulate zur Verfügung. Ohne seine Großzügigkeit und Hilfsbereitschaft auch sein umfassendes Wissen zur Kryokonservierung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Frau Dr. Riesenbeck aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie stellte mir auch einige frische bovine Ejakulate zur Verfügung.

Herr PD Dr. Konrad half mir bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Ein besonderer Dank gilt den ehemaligen Mitarbeitern des Laborteams, Frau Sabine Gröger und Frau Anika Brummer, die mir mit viel Geduld alles im Labor beibrachten.

Des Weiteren danke ich den Kollegiaten, Katja, Stefan, Rina, Carola, Friederike, Miriam, Ralph, Monika, Silvia, Ruth, Horst, Mohammed, Milen und Eva, die mich durch motivierende Gespräche unterstützt haben.

Die Arbeit entstand mit freundlicher Unterstützung eines DAAD-Stipendiums sowie eines Doktoranden-Stipendiums des Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“.

B Veröfentlichungen im Rahmen der Doktorarbeit

B.1 Originalarbeiten

Hinsch KD, Aires V, Hägele W, Hinsch E. (2000) In vitro tests for essential sperm functions using the phyto-oestrogen genistein as a test substance. *Andrologia* 32 (4-5): 225-231.

Aires V, Hinsch E, Hinsch KD. (2001) Effect of genistein upon sperm function. *Andrologia* 33 (4): 234-235.

Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. Comparison of an egg yolk- and a soy bean lecithin-based extender for cryopreservation of bovine semen: motility, acrosome reaction, binding to the zona pellucida, and non-return rates. *Theriogenology*, submitted.

B.2 Buchbeiträge

Hinsch KD, Aires V, Hinsch E. (2000) Environmental hazards and in vitro systems for sperm malfunction: In: *Modern Art & Andrology in the 2000's*. Ombelet W, Vereecken K, Deprest J, Hanssens M, Timmermann, D (eds). *Book of Abstracts and Miniposters, 6th Edition of „Andrology in the Nineties“*, pp 115-117.

B.3 Publierte Abstracts

Aires V, Hinsch E, Schill WB, Hinsch KD. (2000) Genistein inhibits the progesterone- and ZP3-6 peptide-induced acrosome reaction. *Reproduction in Domestic Animals* 35 (1): 11.

Mueller-Schloesser F, Aires V, Hinsch E, Schill WB, Hinsch KD. (2001) Investigation of an egg yolk-free andrological medium for freezing of bovine ejaculates. *Reproduction in Domestic Animals* 35 (1): 38.

Aires V, Hinsch E, Schill WB, Hinsch KD. (2001) Effect of genistein upon tyrosine phosphorylation in cryopreserved bovine spermatozoa. DVG-Proceedings der 34. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Gießen, 22.-23. Februar 2001: 5.

Mueller-Schloesser F, Aires V, Hinsch E, Hinsch KD. (2001) Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk-free semen diluters for cryopreservation of bovine semen. DVG-Proceedings der 34. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Gießen, 22.-23. Februar 2001: 54.

Aires VA, Hinsch E, Hinsch KD. (2002) Assessment of capacitation in genistein-treated cryopreserved spermatozoa using the chlortetracycline fluorescence (CTC) assay. DVG-Proceedings der 35. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Leipzig, 14.-15. Februar 2002: 16.

C Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Viviana Andrea Aires
Geburtsdatum: 28.10.1972
Geburtsort: Córdoba, Argentinien
Staatsangehörigkeit: argentinisch
Familienstand: ledig

Ausbildung

1979–1982 Grundschule „Juan Zorrilla de San Martin“, 1. bis 4. Klasse.
1983 Grundschule „Jose Caeiro“, 5. Klasse.
1984–1991 Oberschule „Escuela Superior de Comercio Manuel Belgrano“.
1992 Beginn des Studiums der Biologie an der Nationaluniversität Córdoba, Argentinien
04.1996–08.1997 Diplomarbeit im Institut für Physiologie, medizinische Fakultät, Nationaluniversität Córdoba. Betreuer: Dr. Andres Ponce.
20.08.1997 Abgabe der Diplomarbeit. Note: 10.
Abschluss des Studiums: Durchschnittsnote 8,5 (Skala 0 bis 10)

Promotion

06.–09.1998 Deutschkurs am Goethe-Institut Mannheim mit bestandener Prüfung zum „Zertifikat Deutsch als Fremdsprache“. Gesamtnote: gut.
10.1998–09.2000 DAAD Stipendium für eine Forschungsarbeit im Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.
Seit 10.1999 Stelle als Kollegiatin im Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ der Universitäten Gießen und Marburg.
Seit 10.2000 Stipendium des Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ der Universitäten Gießen und Marburg.

Stichwortverzeichnis

Symbols	
4x Tris/SDS	33
A	
Acrylamidgele	
Sammelgel	34
Trenngel	34
Agglutination	42
akrosomaler Status	19, 21
AIL	21
AIT	21
ARL	21
ART	21
Akrosomreaktion	19, 78
Genistein	84
frisches Ejakulat	49
kryokonservierte Spermatozoen ..	50
Induktion	21, 67, 83
frisches Ejakulat	24
Glaswollsäule-Filtration	44
kryokonservierte Spermatozoen ..	25,
41	
Progesteron	41, 78
ZP3-6 Peptid	41, 80
molekulare Basis der	81
und Calcium	81
und cAMP	81
und Chlorid-Kanäle	82
und Kinase	82
und Phospholipase	82
ALH	18
AndroMed [®]	13
Akrosomreaktion	41
Kryokonservierung	39
Motilität	39
Antikörper	
Anti-Phosphotyrosin	31
C	
CASA-System	17, 66
Chemielumineszenz	32 f.
Chlortetracyclin-Analyse	35, 76
Genistein	58, 78
Coomasie-Blau-Entfärbelösung	35
Coomasie-Blau-Färbelösung	35
CTC-Färbelösung	37
CTC-Fixierungslösung	37
CTC-Muster	37
AR	36
B	36
F	36
CTC-ParaformaldehydFixierungslösung .	37
CTC-Paraformaldehydlösung	37
CTC-Puffer	38
E	
ECL	32
Ejakulate	12
Elektrophorese	26
Durchführung	30
Extraktionspuffer	33
F	
Färbelösung	
Coomasie-Blau	35
CTC	37
Färbung	
Hoechst 33258	19
PSA-FITC	20

G		L	
Genistein	68	Laufpuffer	34
Akrosomreaktion	49	M	
Chlortetracyclin-Analyse	58	Motilitätsmessung	17
Einfluss auf die Spermatozoenfunktion		Genistein	
46		frisches Ejakulat	46
Motilität	46	kryokonservierte Spermatozoen ..	47
Stocklösung	23	nach Kryokonservierung	40
Tyrosinphosphorylierung	27, 52	mit AndroMed®	39
Vitalität	47	mit Tris-Eigelb	39
Glaswollsäule-Filtration	16, 67	Motilitätsparameter	19
Akrosomreaktion	44	hyperaktiv	18
H		immotil	18
HAM F10 Medium	15	linearmotil	18
Tyrosinphosphorylierung		lokalmotil	18
frisches Ejakulat	55	nicht-linear motil	18
kryokonservierte Spermatozoen ..	57	progressivmotil	18
I		P	
Immunoblot	26, 31	Phytoöstrogen	
K		Genistein	68
Kapazitation	69	Progesteron	21
molekulare Basis der	69	Akrosomreaktion	
Test zur Untersuchung der	76	Genistein	49 f.
CTC	76	kryokonservierte Spermatozoen ..	41
Tyrosinphosphorylierung	52	nach Galswollsäule-Filtration	44
und Albumin	72	Proteasehemmstoffen	30
und Bikarbonat	72	Proteinextraktion	26
und Calcium	72	frisches Ejakulat	26, 29
und cAMP	73	kryokonservierte Spermatozoen ..	27, 29
und freie Radikale	73	Portionierung	30
und Glucose	74	Protesasehemmstoffe	34
und Heparin	74	S	
und Membranpotenzial	73	Sammelgel	30, 34
und pH	73	Sammelgelpuffer	34
und Proteintyrosinphosphorylierung	74	statistische Auswertung	38
Kryokonservierung	13, 39, 64	Swim-up	14 f., 67
Kryoprotektiva		T	
AndroMed®	13	T-TBS	35
Tris-Eigelb	13	TALP-H-Medium	27

TALP-Medium	27
Tyrosinphosphorylierung	
frisches Ejakulat	53
kryokonservierte Spermatozoen ..	56
Trenngel	30, 34
Trenngelpuffer	34
Tris-Eigelb	13
Akrosomreaktion	41
Kryokonservierung	39
Motilität	39
Tween-Tris buffered saline	35
Tyrosinphosphorylierung	76
Genistein	52
Identifizierung phosphorylierter Protei- ne	31
U	
Umwelttoxene	62
Unfruchtbarkeit und Umwelt	61
V	
VAP	18
VCL	18
Vitalität	19
Genistein	
frisches Ejakulat	47
kryokonservierte Spermatozoen ..	48
VSL	18
W	
Western Blot	26
Durchführung	30
Western-Blot-Puffer	35
Z	
ZP3	21
ZP3-6 Peptid	
Akrosomreaktion	
Genistein	50
kryokonservierte Spermatozoen ..	41
nach Galswollsäule-Filtration	44

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen der Arbeit, die anderen Quellen im Wortlaut oder Sinn entnommen wurden, sind durch Angaben der Herkunft kenntlich gemacht.

Gießen, Juni 2002