

## Abkürzungsverzeichnis

A23187	Kalziumionophor A23187
AK	Antikörper
AR	Akrosomreaktion
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BAPTA	(1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)
bH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
BSA	Rinder Serumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	enhanced Chemoluminiszenz
EGTA	Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)- N,N,N',N'-tetraacetic acid
FITC	Fluorescein-Isotiozyanat
g	Erdbeschleunigung
MG	Molekulargewicht
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin
Phosstd.	Phosphorylierungsstandard
PI	Propidiumjodid
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	kalzium-abhängige Proteinkinase
pNaCl	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Prog	Progesteron
PSA	<i>Pisum sativum</i> - Agglutinin
PVS	penile Vibrostimulation (engl. <i>penile vibratory stimulation</i> )
PVP	Polyvinylpolypyrrolidon
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. <i>standard error of the mean</i> )
TALP	Tyrode´s Albumin Laktat Pyruvat Medium
TALPmC	TALP mit Kalzium
TALPmEGTA	TALP mit EGTA
TALPoC	TALP ohne Kalzium
UV	ultraviolettes Licht
VW	Vaginalspülung (engl. <i>vaginal washing</i> )
ZP	<i>Zona pellucida</i>

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

### 1. Einleitung

1.1 Morphologie	2
1.2 Passage durch den Nebenhoden	3
1.3 Kapazitierung <i>in vivo</i>	3
1.4 Kapazitierung <i>in vitro</i> und kapazitierungs-assoziierte Ereignisse	5
1.4.1 Proteinphosphorylierung	5
1.4.2 Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration	6
1.4.3 Hyperaktivierung	7
1.4.4 Veränderung der Spermatozoenoberfläche	7
1.5 Kapazitierungs-assoziierte Ereignisse und deren Nachweismethoden	8
1.6 Bindung an die <i>Zona pellucida</i>	9
1.7 Akrosomreaktion	9
1.8 Faktoren, die Kapazitierung und Akrosomreaktion <i>in vitro</i> beeinflussen	11
1.8.1 Albumin	11
1.8.2 Heparin	11
1.8.3 cAMP und Coffein	12
1.8.4 Kalzium	13
1.8.5 Progesteron	14
1.8.6 Sekrete des weiblichen und männlichen Genitaltraktes	14
1.9 Kenntnisstand bei Primaten	15
1.10 Das Untersuchungsobjekt	17
1.11 Ziele dieser Arbeit	18

### 2. Material & Methoden

#### **Spermatozoensammlung, Präparation & Etablierung grundlegender Methoden**

2.1 Versuchstiere	20
2.2 Spermatozoengewinnung	21
2.2.1 penile Vibrostimulation (PVS)	21
2.2.2 Vaginalspülung (engl. <i>vaginal washing</i> ; VW)	21
2.2.3 epididymale Spermatozoen	23
2.3 Routinebeurteilung und Präparation der Samenproben	23
2.3.1 <i>swim up</i>	24
2.3.2 Dichtegradientenzentrifugation	24
2.3.3 Präparation humaner Spermatozoen	25
2.4 Charakterisierung von Viabilität und Akrosomzustand	25

2.4.1	Methoden zur Erfassung der Viabilität	25
2.4.1.1	Hypo-osmotischer Schwellungstest (nach WHO)	25
2.4.1.2	Fluoreszenzfärbung mit Propidiumjodid (PI)	26
2.4.1.3	Fluoreszenzfärbung mit Höchst 33258	26
2.4.2	Erfassung des Akrosomzustandes	27

### **Untersuchungen zu Kapazitierung und Akrosomreaktion *in vitro***

2.5	Versuchsprotokolle	28
2.5.1	Charakterisierung der Kapazitierung <i>in vitro</i> und Untersuchungen zu beeinflussenden Faktoren	29
2.5.1.1	Einfluß von Heparin	30
2.5.1.2	Einfluß von cAMP und Coffein	30
2.5.2	Einfluß von extrazellulärem Kalzium	30
2.5.2.1	auf Kapazitierung und Akrosomreaktion	31
2.5.2.2	auf die Proteinphosphorylierung	32
2.5.2.3	auf Bindungsfähigkeit an die <i>Zona pellucida</i>	36
2.5.3	Physiologische Induktion der Akrosomreaktion	37
2.5.3.1	Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron	38
2.5.3.2	Dosis-Wirkung-Beziehung	38
2.5.3.3	Rezeptornachweis	38
2.5.4	Einfluß von intrazellulärem Kalzium	39
2.6	Statistik	40

## **3. Ergebnisse**

### **Spermatozoensammlung, Präparation & Etablierung grundlegender Methoden**

3.1.	Spermatozoensammlung	41
3.2.	Vergleich verschiedener Aufreinigungstechniken	45
3.3.	Detektion toter Spermatozoen	46

### **Untersuchungen zu Kapazitierung und Akrosomreaktion *in vitro***

3.4.	Untersuchungen zu Faktoren, die die Kapazitierung beeinflussen	47
3.4.1	Zeitverlauf	47
3.4.2	Einfluß von Heparin	50
3.4.3	Einfluß von cAMP und Coffein	51
3.4.4	Einfluß der Methode der Spermatozoengewinnung	52

### **Untersuchungen zum Einfluß von Kalzium *in vitro***

3.5.	Einfluß von extrazellulärem Kalzium	53
3.5.1	auf Kapazitierung und Akrosomreaktion	54

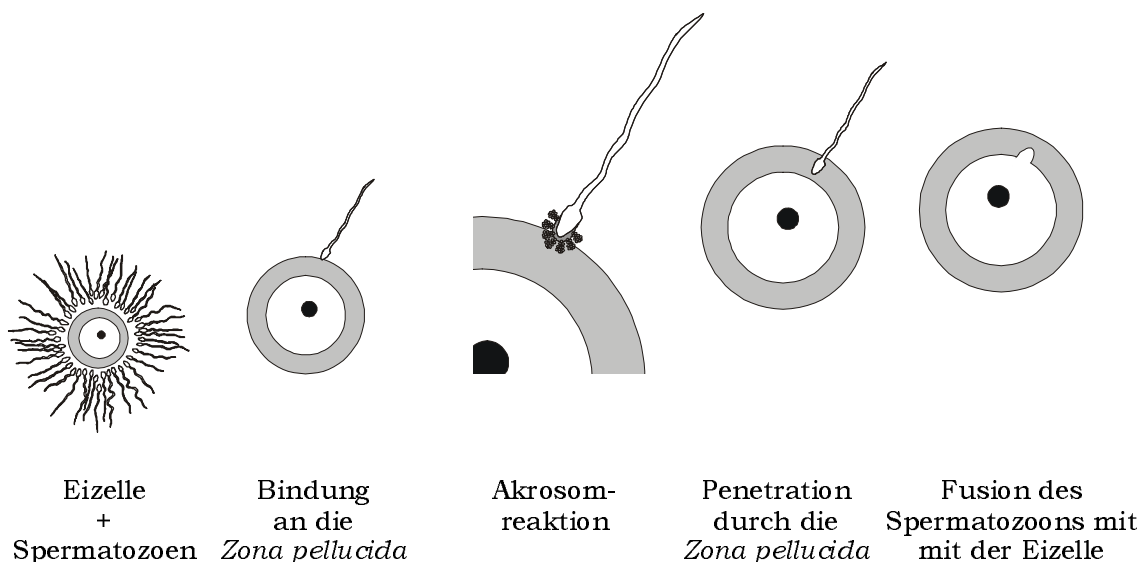
3.5.2 auf die Proteinphosphorylierung	59
3.5.3 auf Bindungsfähigkeit an die <i>Zona pellucida</i>	62
3.6 Physiologische Induktion der Akrosomreaktion	67
3.6.1 Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron	67
3.6.2 Dosis-Wirkung-Beziehung	68
3.6.3 Rezeptornachweis	69
3.7 Einfluß von intrazellulärem Kalzium	70
<b>4. Diskussion</b>	
<b>Spermatozoensammlung, Präparation &amp; Etablierung grundlegender Methoden</b>	
4.1 Spermatozoensammlung	72
4.2 Vergleich <i>swim up</i> und Percoll-Zentrifugation	74
4.3 Detektion toter Spermatozoen	75
<b>Kapazitierug und Akrosomreaktion <i>in vitro</i></b>	
4.4 Zeitverlauf	76
4.5 Einfluß von Kapazitierugsförderern	78
4.6 Einfluß der Gewinnungsmethode	81
<b>Einfluß von Kalzium auf Reifungs- und Fertilisationsschritte sowie die Akrosomreaktion</b>	
4.7 Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf Kapazitierug und Akrosomreaktion	82
4.8 Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf Proteinphosphorylierug	86
4.9 Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf die Bindung an die <i>Zona pellucida</i>	87
4.10 Physiologische Induktion der Akrosomreaktion	89
4.11 Einfluß von intrazellulärem Kalzium	90
<b>5. Schlußbemerkungen</b>	92
<b>6. Zusammenfassung</b>	95
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	97
<b>Anhang</b>	
<b>Danksagung</b>	
<b>Erklärung</b>	

## **Lebenslauf**

## 1. Einleitung

„Sexualität ist das Kardinalproblem der Evolutionsbiologie. Möglicherweise hat kein anderes natürliches Phänomen so viel Interesse geweckt, mit Sicherheit hat keines so viel Verwirrung gestiftet.“ (Bell, 1982). Vor allem zwei Punkte begründen dieses große Interesse, das die sexuelle Fortpflanzung immer wieder in den Fokus der Diskussionen bringt: erstens ist die geschlechtliche Fortpflanzung und ihre Evolution mit sehr hohen Kosten verbunden und widerspricht somit dem Konzept der Evolution, der Kostenminimierung. Zweitens erfordert sie enorme Anpassungen und Spezifikationen, die sie für evolutionsbiologische Betrachtungen besonders interessant macht. Durch die sexuelle Fortpflanzung entsteht jedoch auch ein entscheidender Vorteil: die Sicherung der genetische Variabilität einer Population aufgrund der ständigen Neukombination des elterlichen Erbmaterials. Dieser Vorteil scheint den enormen Aufwand der sexuellen Fortpflanzung zu rechtfertigen.

Eine allgemeingültige Definition der sexuellen oder geschlechtlichen Fortpflanzung ist die Verschmelzung von zwei haploiden Geschlechtszellen verschiedener Individuen, den Gameten. Voraussetzung für diese Verschmelzung ist das Aufeinandertreffen der Gameten, bei Säugetieren meist im weiblichen Genitaltrakt. Diese Verschmelzung wird auch als Befruchtung bezeichnet. Das Ergebnis der Befruchtung der Eizelle (Oocyte) durch die Samenzelle (Spermatozoon) ist die diploide Zygote. Der eigentlichen Befruchtung geht eine Vielzahl von Reifungsschritten sowie eine Kaskade von Ereignissen voraus, die unter dem Begriff „Gameten Interaktionen“ zusammengefaßt werden können (Abb.1).



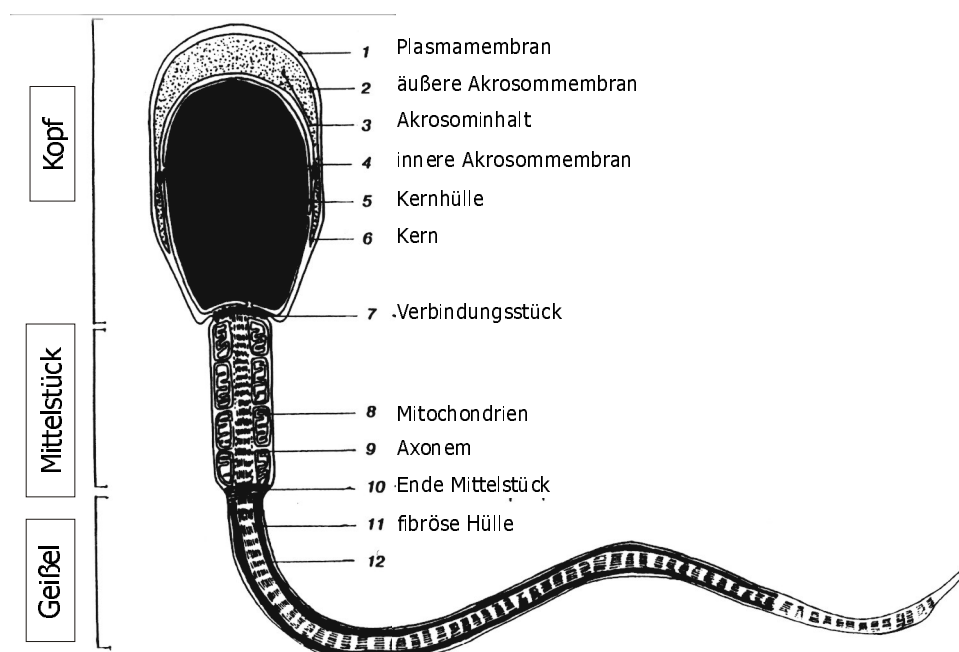
**Abb. 1** Schematische Darstellung der Eizell-Spermatozoen-Interaktionen

Diese Interaktionen der Gameten finden bei den meisten bisher untersuchten Säugern im weiblichen Genitaltrakt statt und haben zwei wesentliche Funktionen: erstens die Synchronisation der Gameten für den eigentlichen Fertilisationsprozess und zweitens die Gewährleistung einer artspezifischen Fusion von Oocyte und Spermatozoon. Auf zwei Ereignisse dieser Interaktionen, die Bindung des Spermatozoons an die *Zona pellucida* und die Akrosomreaktion soll später genauer eingegangen werden.

### 1.1 Morphologie

Spermatozoen sind die Gameten des Männchens. Das Spermatozoon ist das Produkt der Spermatogenese, der Entwicklung der männlichen Geschlechtszellen aus den Spermatogonien. Die Urgeschlechtszellen durchlaufen in den Hodenkanälchen des Hodens (Testis) mitotische und meiotische Teilungen, deren Ergebnis haploide Spermatiden sind. Die Umwandlung dieser Spermatiden in Spermatozoen wird als Spermiohistogenese bezeichnet. Das Produkt dieser Ereignisse ist ein morphologisch vollständiges, hoch differenziertes Spermatozoon, das aber unbeweglich und auch noch nicht befruchtungsfähig ist.

Die Morphologie der Spermatozoen variiert zwischen den bisher untersuchten Spezies sehr stark und ist in zahlreichen Arten noch nicht charakterisiert. Jedoch wird stets die Grundeinteilung Kopf, Mittelstück und Schwanz eingehalten (Abb. 2).



**Abb. 2** Schematischer Aufbau eines Säugetierspermatozoons nach Fazeli (1996) mit Modifikationen

Der Spermatozoenkopf enthält das genetische Material, das von einer Kernhülle ohne Poren umgeben wird. Sehr gering ist der Raum für Zytoplasma und von anderen Zellen bekannte Komponenten. Ein wichtiges Organell des Spermatozoons ist das Akrosom. Dabei handelt es sich um eine den Spermatozoenkopf überziehende Kappe, deren Ursprung der Golgiapparat der Spermatiden ist. Die Form des Akrosoms variiert von Spezies zu Spezies sehr stark, die Basisstruktur ist jedoch stets gleich. Man unterscheidet die akrosomale Kappe und das anschließende Äquatorialesegment. Die akrosomale Kappe ist reich mit hydrolysierenden Enzymen beladen (z. B. Hyaluronidasen, Akrosin, saure Proteinase, Esterasen), die durch ihre lysierende Wirkung entscheidend für die Penetration der Spermatozoen durch die Schutzhüllen der Eizelle sind.

An den Spermatozoenkopf schließt sich das Flagellum an, das aus 4 Abschnitten besteht: Verbindungs-, Mittel-, Haupt- und Endstück. Die wichtigsten Strukturen des gesamten Flagellums sind das Axonem, die Mitochondrienscheide sowie die fibröse Hülle und die Mantelfasern (Millette, 1998).

Die Struktur des Flagellums weicht vom allgemeinen Aufbau einer Geißel aus 2 zentralen Mikrotubuli, die von 9 Paaren Mikrotubuli umgeben werden, etwas ab. Das Säugetierspermatozoon zeigt ein 9+9+2 Muster, da das Axonem (9+2) von 9 Mantelfasern umgeben wird. Die fibröse Hülle umgibt dieses Axonem und reicht vom Verbindungsstück bis zum Hauptstück der Spermatozoengeißel. Die Mitochondrienscheide bildet das Mittelstück des Spermatozoons. Aufgebaut ist diese aus helikal um die äußere dichte Scheide angeordneten Mitochondrien, die in hohem Maß Adenosintriphosphat (ATP) bilden. Am Ende des Mittelstücks wird die Mitochondrienscheide durch die Mantelfasern ersetzt. Sie besteht aus Zytoskelett-ähnlichen Proteinen und bedeckt das gesamte Hauptstück der Spermatozoengeißel. Alle Strukturen werden von der Spermatozoenplasma-Membran umgeben.

## **1.2 Passage durch den Nebenhoden**

Die Fähigkeit zur Bewegung und zur Interaktion mit der Eizelle erlangen die Spermatozoen während der Passage durch den Nebenhoden (Epididymis). Der Nebenhoden ist ein Organ mit sehr hoher sekretorischer Aktivität, das auf dem Hoden aufliegt. Das Spermatozoon, das während des Aufenthaltes im Nebenhoden in direktem Kontakt zu den Sekreten der Epididymis steht, erfährt hier vor allem umfangreiche Veränderungen der Membranstruktur (Thaler & Cardullo, 1995). Das entscheidendste Ergebnis am Ende der Reifungsprozesse im Nebenhoden ist das Erlangen der progressiven Motilität. Doch auch zu diesem Zeitpunkt ist das Spermatozoon immer noch nicht in der Lage, die Eizelle zu befruchten.

## **1.3 Kapazitierung *in vivo***

Die Befruchtungsfähigkeit erlangt die Samenzelle während der sogenannten Kapazitierung (engl. *capacitation*), der Endphase der Spermatozoenreifung. Dieser Begriff, der vor nunmehr 50 Jahren in die Spermatozoenforschung eingeführt wurde, besitzt eigentlich bis heute keine eindeutige, klar abgegrenzte Definition. Chang (1951) und Austin (1951) stellten unabhängig voneinander fest, daß Spermatozoen von Ratten und Kaninchen nicht fähig sind, sofort nach



der Insemination des Weibchens eine Eizelle zu befruchten. Beide Arbeiten zeigten, daß zunächst der Aufenthalt im weiblichen Genitaltrakt über einen definierten Zeitraum notwendig war, bevor das Spermatozoon die Eizelle penetrieren konnte. Die Prozesse, die in dieser Zeit zu Veränderungen am/im Spermatozoon führen, wurden durch Chang und Austin als Kapazitiering definiert. „*The term capacitation is used to denote a physiologic change that spermatozoa are believed to undergo as a necessary preliminary to penetration into eggs.*“ (Austin, 1967). Heute, fast 50 Jahre nach dieser Entdeckung sind einzelne Teilprozesse der Kapazitiering bekannt, sind Bedingungen und Regulationsmechanismen untersucht. Ein Blick über die Literatur macht vor allem deutlich, daß eine Vielzahl von Reifungs- und Modifikationsereignissen des Spermatozoons unter dem Begriff Kapazitiering zusammengefaßt werden müssen.

Trotz der umfangreichen Literatur sind viele Fragen immer noch unbeantwortet, vor allem die Verbindungen zwischen den einzelnen kapazitierings-assoziierten Ereignissen noch nicht aufgeklärt. Nicht zuletzt liegt dies an fehlenden Methoden, die die Charakterisierung der Kapazitiering als Gesamtheit ermöglichen würden. Die meisten Untersuchungen beschränken sich auf Teilprozesse und es liegen kaum Studien vor, die verschiedene Teilprozesse unter gleichen Bedingungen konsequent in einer Spezies betrachten. Jedoch sind Kenntnisse über die Gesamtheit dieser Prozesse von entscheidender Bedeutung sowohl für die biologische Grundlagenforschung, um artspezifische Unterschiede erkennen zu können als auch für die biomedizinische Forschung, um die Aufklärung verschiedener Fertilitätsstörungen zu ermöglichen.

*In vivo* beginnt die Kapazitiering mit der Penetration des Zervikalmukus und setzt sich im Eileiter (*Ovidukt*), ein Abschnitt des weiblichen Genitaltraktes fort. Eine wichtige Besonderheit der Kapazitiering *in vivo* ist, daß die Spermatozoenpopulation nicht synchron kapazitiert. So kann erreicht werden, daß zu jedem Zeitpunkt befruchtungsfähige Spermatozoen auf die Eizelle treffen. Verschiedene Studien beschäftigen sich mit den Funktionen des Eileiterepithels sowie den Regulationsmechanismen und Effektoren, durch die im weiblichen Reproduktionstrakt der Verlauf der Kapazitiering *in vivo* beeinflusst werden kann (reviewed: Boatman, 1997; Mastroianni & Stambaugh, 1974). So unterstützen verschiedene Komponenten der Eileiterflüssigkeit (z.B. Glukose, Laktat, Pyruvat) das Überleben der Spermatozoen während der Passage durch den Eileiter (Menezo & Guerin, 1997) und auch Eileiter-spezifische Proteine dienen der Erhaltung der Lebensfähigkeit und der Motilität der wenigen Spermatozoen, die tatsächlich den Befruchtungsort erreichen (Abe et al., 1995). Außerdem fördern heparin-ähnliche Glykosaminoglykane in der Eileiterflüssigkeit z.B. die Kapazitiering boviner Spermatozoen im Eileiter (Parrish et al., 1989).

Obwohl diese Studien zahlreiche Informationen über die Bedeutung des Eileiters für die *in vivo*-Kapazitiering der Spermatozoen liefern, haben sie doch einen entscheidenden Nachteil: über die Ereignisse und Veränderungen während der Kapazitiering im Spermatozoon selbst erlauben sie fast keine Aussage.

## 1.4 Kapazitierung *in vitro* und kapazitierungs-assoziierte Ereignisse

Erst die Entwicklung von Medien, die die Induktion der Kapazitierung *in vitro* ermöglichten, führte dazu, daß Teilereignisse dieses Reifungsprozesses näher untersucht werden konnten. Zahlreiche *in vitro* Studien versuchen seitdem aufzuklären, welche Veränderungen das Spermatozoon während der Kapazitierung erfährt und welchen Regulationen diese Veränderungen unterliegen. Die umfangreiche Literatur (reviewed u.a. in Clegg, 1983) zeigt, daß unter dem Begriff Kapazitierung nach heutigem Stand der Erkenntnisse zahlreiche Veränderungen im Stoffwechsel, in der Membranstruktur, in der Motilität, in der intrazellulären Ionenkonzentration und auch im Akrosom verstanden werden müssen. Weiterhin wird deutlich, daß innerhalb dieser Veränderungen große Unterschiede zwischen den bislang untersuchten Spezies bestehen. Im folgenden werden einige mit der Kapazitierung assoziierte Ereignisse näher erläutert.

### 1.4.1 Proteinphosphorylierung

Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein weit verbreiteter Aktivierungsprozeß in somatischen Zellen (Stryer, 1991). Effektoren zahlreicher Stoffwechselwege werden durch die Phosphorylierung bestimmter Proteine aktiviert und reguliert.

Die Phosphorylierung verschiedener Proteine an der Aminosäure Tyrosin vermittelt zahlreiche Zellfunktionen wie z.B. Wachstum, Kontrolle des Zellzykluses und Regulation von Ionenhaushalt und Rezeptoren (reviewed, Visconti & Kopf, 1998).

Auch in Spermatozoenzellen ist die Proteinphosphorylierung ein wichtiger Initiator zellulärer Signaltransduktionen und fungiert beispielsweise als Indikator für Veränderungen des intrazellulären Stoffwechsels während der Kapazitierung (Mahony & Gwathmey, 1999). Naz & Ahmad (1991) zeigten in einer Untersuchung humaner Spermatozoen, daß der Grad der Phosphorylierung und die Zahl phosphorylierter Proteine während der Inkubation unter Bedingungen, die auch die Kapazitierung fördern, zunimmt. In Mauspermatozoen ist die Phosphorylierung von Spermatozoenproteinen an der Aminosäure Tyrosin ein mit der Kapazitierung assoziiertes Ereignis (Visconti et al., 1995a). Die Autoren konnten zeigen, daß Spermatozoen aus dem Nebenhodenkopf, denen die epididymale Reifung fehlt und die trotz Inkubation daher auch nicht kapazitieren können, auch keine Zunahme der Phosphorylierung zeigen. Inzwischen liegen zahlreiche Studien für Mensch, Nutz- und Haustier, aber auch für Primaten vor, die eine Assoziation der Phosphorylierung mit der Kapazitierung beweisen (Mensch: Emiliozzi & Fenichel, 1997; Luconi et al., 1995; Rind: Galantino-Homer et al., 1997; Eber: Kalab et al., 1998; Makak: Mahony & Gwathmey, 1999; Hamster: Visconti et al., 1999). Spermatozoenproteine, die durch die Phosphorylierung aktiviert werden, sind in die verschiedensten Prozesse involviert: Motilität (Mensch: Leclerc et al., 1996; Maus: Duncan & Fraser, 1993; Tash & Bracho, 1998), Akrosomreaktion (Maus: Duncan & Fraser, 1993), Bindung an die *Zona pellucida* (Maus: Leyton & Sailing, 1989; Kalab et al., 1994; Mensch: Naz & Ahmad, 1991). Auch in Primatenspermatozoen konnte inzwischen eine kapazitierungs-assoziierte Phosphorylierung verschiedener Proteine nachgewiesen werden (*Macaca fascicularis*: Mahony & Gwathmey, 1999; Yeung et al., 1999).

Vermittelt wird die Phosphorylierung der Spermatozoenproteine wie auch in somatischen Zellen durch zwei Proteinkinasen, Enzyme, die eine Phosphorylgruppe von ATP (Adenosintri-phosphat) auf ein Protein übertragen (Stryer, 1991). Die Proteinkinase A (PKA) wird durch cAMP-Kaskade aktiviert, die Proteinkinase C (PKC) dagegen durch eine Phosphoinositidkaskade, die von Kalzium beeinflusst wird. Die Existenz beider Systeme ist für Spermatozoen aller bisher untersuchten Spezies nachgewiesen (PKA: reviewed in Visconti & Kopf, 1998; PKC: Tollner et al., 1995).

Aufgrund der für verschiedene Spezies nachgewiesenen Assoziation zwischen Kapazitierung und der Proteinphosphorylierung eignet sich dieses Ereignis, um Bedingungen und Regulationsmechanismen der Kapazitierung zu charakterisieren.

#### 1.4.2 Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration

Ein weiteres mit der Kapazitierung assoziiertes Ereignis ist die Veränderung der intrazellulären Konzentration verschiedener Ionen. In vielen Zellen erfolgt die Signaltransduktion unter anderem durch Ionengradienten, die an der Plasmamembran aufgebaut werden (Stryer, 1991). Auch in Spermatozoenzellen werden verschiedene Signale durch Ionengradienten vermittelt (reviewed, Yanagimachi, 1994). In Spermatozoenzellen sind u.a. Kalium, Natrium und Kalzium involviert, wobei das letztere im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen steht. Die Änderung der intrazellulären Konzentration freien Kalziums während der Kapazitierung ist ein kontrovers diskutiertes Thema der Spermatologie. Während einige Arbeiten für verschiedene Spezies die Akkumulation von Kalzium intrazellulär im Verlauf der Kapazitierung zeigen (u.a. Baldi et al., 1991; Parrish et al., 1999), fehlt der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in den Spermatozoen von Kaninchen (Mahanes et al., 1986). In Rinderspermatozoen werden durch den Anstieg der Kalziumkonzentration in der Zelle verschiedene Prozesse der Kapazitierung (z. B. die Proteinphosphorylierung) getriggert (Parrish et al., 1998). Für die Akkumulation des intrazellulären freien Kalziums werden zwei Quellen diskutiert: extrazelluläres Kalzium (z. B. *in vitro* aus dem Kapazitierungsmedium; reviewed bei Baldi et al., 1996) oder aus intrazellulären Lagern (Parrish et al., 1999). *In vivo* wird die Eileiterflüssigkeit als Quelle des extrazellulären Kalziums diskutiert (Mastroianni & Stambaugh, 1974).

Kalzium eignet sich aus verschiedenen Gründen als Botenmolekül verschiedenster Aktivierungsprozesse. Viele Zellen verfügen über Transportsysteme, die Kalzium ohne großen Energieaufwand aus der Zelle pumpen und so die intrazelluläre Konzentration des Ions sehr niedrig halten können. Der steile Konzentrationsgradient zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Milieu ermöglicht nach einem Signal einen plötzlichen Einstrom von Kalzium in die Zelle und damit eine schnelle Änderung der intrazellulären Konzentration, die wiederum die rasche Aktivierung verschiedener Prozesse triggert (Berridge & Bootmann, 1996). Ein weiterer Grund für die Eignung von Kalzium als intrazelluläres Botensubstanz sind seine Bindungseigenschaften: Kalzium hat einerseits eine sehr hohe Affinität zu Proteinen und andererseits die Fähigkeit bis zu acht Liganden zu binden. Dadurch werden große Konfigurationsänderungen der Proteine möglich (Stryer, 1991).

Untersuchungen u.a. zur Aktivierung der Adenylatzyklase durch Kalzium (Visconti et al., 1995b), zur Stimulation der Proteinkinase C durch Kalzium (Thomas & Meizel, 1989) und der Phosphodiesterase (Hyne & Garbers, 1979) verdeutlichen die zentrale Rolle dieses Ions in der Spermatozoenzellen. Somit wird Kalzium zu einem wichtigen Untersuchungsobjekt bei der Charakterisierung der Physiologie von Spermatozoen und beim Vergleich verschiedener Spezies. Für Spermatozoen von Primaten sind bislang keine Studien zum Einfluß von Kalzium auf die Kapaziterung bzw. auf kapaziterungs-assoziierte Ereignisse bekannt.

#### 1.4.3 Hyperaktivierung

Eine gut zu beobachtende, ebenfalls unter Kapaziterungsbedingungen auftretende Veränderung der Spermatozoen ist die schon früh von Yanagimachi (1970) beschriebene Hyperaktivierung befruchtungsfähiger Spermatozoen. Die Fähigkeit zur Bewegung erlangen Spermatozoen während der Passage durch die Epididymis. Dabei handelt es sich meist um eine relativ geradlinige und langsame Bewegung (Yanagimachi, 1994). Dieses Muster der Motilität ändert sich im Verlauf der Inkubation im Kapaziterungsmedium, die Kopfauslenkung der Spermatozoen wird stärker, die Geradlinigkeit der Bewegung nimmt ab (reviewed in Burkman, 1995). Verschiedene Arbeiten zeigen, daß der Anteil hyperaktivierter Spermatozoen mit der Anzahl der durch *in vitro* Fertilisation befruchteten Eizellen korreliert (reviewed in de Lamirande et al., 1997). Robertson et al. (1988) beschreiben für humane Spermatozoen eine Assoziation zwischen dem Auftreten der Hyperaktivität und dem Verlust der akrosomalen Kappe. Für die biologische Bedeutung der Hyperaktivierung gibt es verschiedene Theorien (reviewed in Mortimer et al., 1998). So wird in den hier zitierten Arbeiten vermutet, daß die extreme Motilität der Spermatozoen verhindert, daß sie in den Krypten des Eileiters versinken oder aber, daß damit die Anheftung der Spermatozoen an das Epithel des Eileiters während der Kapaziterung wieder gelöst wird. Eine weitere Funktion dieser energieaufwendigen Motilität könnte auch die Passage des Spermatozoons durch die die Eizelle umgebende Schicht aus den sogenannten Kumuluszellen sein (Bedford & Cross, 1998).

Da einige Untersuchungen zeigen, daß unter bestimmten Bedingungen *in vitro* zwar die Kapaziterung aber nicht die Expression der Hyperaktivierung zu beobachten ist, eignet sich dieses Ereignis weniger, um die Bedingungen der Kapaziterung *in vitro* zu charakterisieren (reviewed in Suarez, 1996).

#### 1.4.4 Veränderung der Spermatozoenoberfläche

Die Spermatozoenoberfläche unterliegt im Verlaufe von Spermiogenese, Spermiohistogenese und auch Kapaziterung zahlreichen Membranänderungen (Clegg, 1983). Die Veränderungen während der Kapaziterung führen zu einer Destabilisierung der Plasmamembran, die eine Voraussetzung für die Akrosomreaktion ist. Im Verlaufe der Kapaziterung ist besonders der Verlust von Bindungsstellen für Zuckerkonjugate hervorzuheben (reviewed in Koehler, 1981). Verschiedene Antikörper und Lektine, z. B. das Weizenlektin (engl.: *wheat germ agglutinin*, WGA) ermöglichen die Detektion dieser Änderungen. Ein weiteres kapaziterungs-assoziierte Ereignis auf der Spermatozoenoberfläche ist die Veränderung der Fluoreszenzsignale, die von

membran-gebundenem Chlortetrazyklin (CTC) ausgehen (Lee et al., 1987). Das Antibiotikum CTC ist ein Chelator von zweiwertigen Kationen, der durch die Bindung von Kalzium fluoresziert (Saling & Story, 1979). Mittels des Chlortetrazyklin-Assays lassen sich in verschiedenen Spezies 3 verschiedene Kapazitierungs- und Akrosomstadien nachweisen (human: DasGupta et al., 1993; Totenkopfpaffe: Kholkute et al., 1990; Ziege: Kaul et al., 1997; Maus: Fraser & McDermott, 1992).

### 1.5 Kapazitierungs-assoziierte Ereignisse und Nachweismethoden

Der hier gegebene Überblick über einige kapazitierungs-assoziierte Ereignisse macht deutlich, daß verschiedenste Prozesse zu Veränderungen in sehr unterschiedlichen Bereichen der Spermatozoenzelle führen: die Phosphorylierung von bestimmten Proteinen bedingt Änderungen u.a. der Motilität, der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion und der Bindungseigenschaften an die *Zona pellucida*, die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt dagegen zur Stimulation oder Inhibition verschiedener Enzyme während die Veränderungen der Spermatozoenmembran die Sensitivität des Spermatozoons für Induktoren der Akrosomreaktion erhöht. Das bedeutet, daß der Begriff Kapazitierung ein Überbegriff für eine Vielzahl von Reifungsprozessen ist und das durch die Betrachtung einzelner Prozesse nicht die gesamte Kapazitierung, ihre Bedingungen und Voraussetzungen charakterisiert werden kann. Die Übersicht über eine Auswahl kapazitierungs-assoziiertes Ereignisse und ihre Nachweismethoden in Tabelle 1 soll verdeutlichen, daß es sich um sehr unterschiedliche Prozesse mit verschiedenen Zielbereichen handelt.

**Tab.1** Auswahl kapazitierungs-assoziiertes Prozesse und deren Nachweismethoden

kapazitierungs-assoziiertes Ereignis	Methode	Literatur
Umverteilung von Glucokonjugaten auf der Spermatozoenoberfläche	Markierung mit Lektinen (WGA)	Navaneetham et al., 1996
Änderung der Kalziumbindung	CTC-Assay	Fraser & Mc Dermott, 1992
Proteinphosphorylierung	Immunodetektion	Visconti et al., 1995
Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$	Messung von $[Ca^{2+}]_i$	Baldi et al., 1991
Induktion der Akrosomreaktion	Induktion mit A23187	Pampligione et al., 1993

Ein wichtiges Ziel der Untersuchungen zur Kapazitierung von Spermatozoen muß deshalb sein, den Einfluß eines Faktors auf mehrere kapazitierungs-assoziiertes Ereignisse innerhalb einer Spezies zu betrachten.

### 1.6 Bindung an die *Zona pellucida*

Nachdem die Reifung der Spermatozoen im Rahmen der Kapazitierung abgeschlossen ist, erfolgt der erste direkte Kontakt zwischen der Oocyte und dem kapazitierten Spermatozoon, die erste Interaktion der Gameten. Das Spermatozoon hat die dichte Schicht aus Kumuluszellen durchdrungen (siehe oben), und trifft nun auf die die Eizelle umgebende *Zona pellucida*.

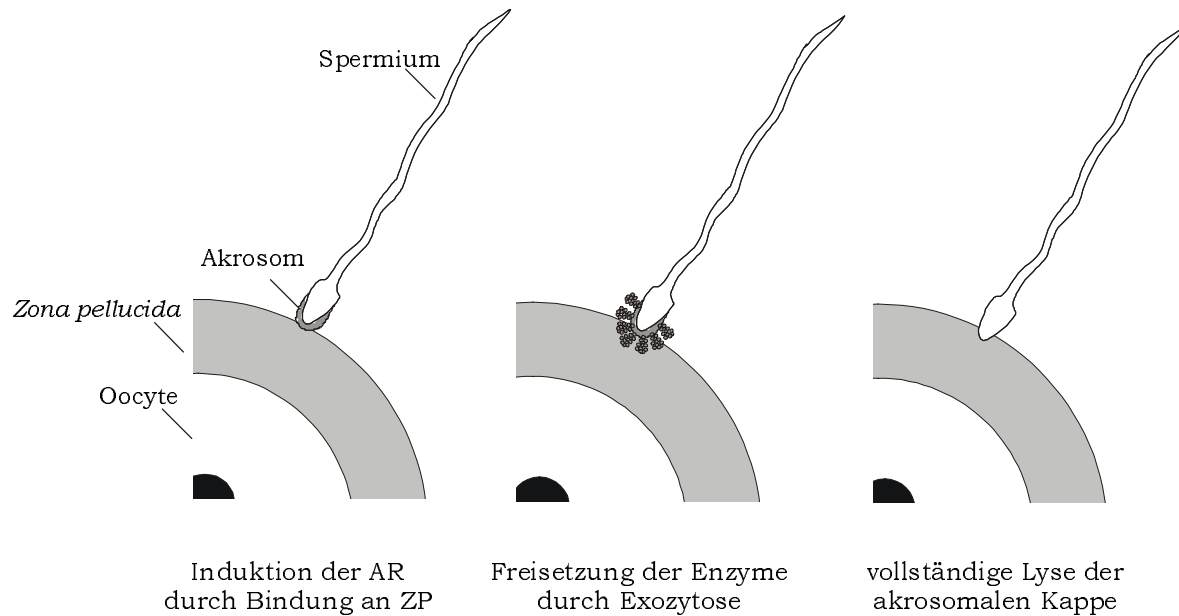
Bei der *Zona pellucida* (ZP) handelt es sich um eine starke azelluläre Hülle aus Glykoproteinen (Dunbar et al., 1980), die in den meisten untersuchten Spezies aus drei Glykoproteinen mit verschiedenen Funktionen besteht: ZP1 (oder ZPB), ZP2 (oder ZPA) und ZP3 (oder ZPC). Eine entscheidende Funktion der *Zona pellucida* ist neben der Bindung der Spermatozoen und der Induktion der Akrosomreaktion (s.u.) die artspezifische Gametenerkennung (reviewed: Brewis & Wong, 1999).

Damit die Gameten verschmelzen können, muß diese Schutzhülle von mindestens einem Spermatozoon durchdrungen werden. Die Penetration des Spermatozoons durch die *Zona pellucida* umfaßt eine Kaskade von Ereignissen. Zunächst erfolgt eine initiale oder primäre Bindung des Spermatozoons an die Eizelle. Diese wird durch die Interaktion zwischen Proteinen auf der Spermatozoenoberfläche und bei den meisten bisher untersuchten Spezies dem ZP3 der *Zona pellucida* induziert (Maus: Leyton & Saling, 1989). Da die Bindungsfähigkeit des Spermatozoons an die *Zona pellucida* eine entscheidende Voraussetzung für die Befruchtung ist, wird sie in zahlreichen Untersuchungen genutzt, um die Befruchtungsfähigkeit *in vitro* kapazitierter Spermatozoen zu beurteilen (Mensch: reviewed in Franken, 1998; Gorilla: Lanzendorf et al., 1992; Weißbüschelaffe: Liu et al., 1991). Die Charakterisierung der Bindungsaffinität erfolgt in verschiedenen Testsystemen: Bindung an intakte, frisch gewonnene Eizellen, Hemizona-Assay oder Bindung an salzgelagerte Eizellen (reviewed in Cummins, 1995).

### 1.7 Akrosomreaktion

Durch die erfolgreiche primäre Bindung des Spermatozoons an die Eizelle wird die Akrosomreaktion induziert (reviewed in Yanagimachi, 1994).

Als Akrosomreaktion (AR) bezeichnet man die Lyse der akrosomalen Kappe auf dem Spermatozoonkopf und die damit verbundene Freisetzung der im Akrosom enthaltenen Enzyme (Austin, 1967). Zur Lyse der akrosomalen Kappe kommt es durch die Fusion der äußeren akrosomalen Membran mit der darüberliegenden Plasmamembran (Yanagimachi, 1994). Durch die so entstandenen Poren werden die im Akrosom gespeicherten Enzyme freigesetzt. Diese Enzyme tragen entscheidend zur Lyse der *Zona pellucida* bei und ermöglichen so die sekundäre Bindung des Spermatozoons an ZP2 sowie die Penetration des Spermatozoons durch die Schutzhülle der Eizelle. Die schematische Darstellung in Abb. 3 soll die Teilschritte der AR verdeutlichen.



**Abb. 3** Schematische Darstellung der AR

Die Akrosomreaktion ist seit vielen Jahren ein zentraler Punkt zahlreicher Untersuchungen zur Spermatozoenphysiologie. Zur Akrosomreaktion, die *in vitro* durch verschiedenste physiologische und nichtphysiologische Induktoren ausgelöst werden kann (Tarin & Trounson, 1994), sind Spermatozoen nur fähig, wenn sie vollständig kapazitiert sind (Lee et al., 1987). Die Induzierbarkeit der AR wird daher in vielen Untersuchungen als Indikator für eine vollständige Kapazitierung *in vitro* eingesetzt. Henkel et al. (1993) konnten zeigen, daß die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion tatsächlich mit der Befruchtungsfähigkeit von humanen Spermatozoen korreliert und Cummins et al. (1991) schlagen den Induktionstest daher als Parameter zur Bestimmung der Fertilität vor. Ein sehr häufig eingesetzter unphysiologischer Induktor ist das Kalziumionophor A23187 (Green, 1978).

Wird die Induzierbarkeit der AR als Parameter zur Beurteilung einer vollständigen Kapazitierung benutzt, stellt sich jedoch folgendes Problem: es kann nur schwer unterschieden werden, ob eine Substanz die Akrosomreaktion und/oder die Kapazitierung beeinflusst (Cohen-Dayag & Eisenbach, 1994). Dies gilt beispielsweise für den Kalziumbedarf der beiden Ereignisse. Während für das exozytotische Ereignis der Akrosomreaktion ein massiver Einstrom des Ions Grundvoraussetzung in allen bisher untersuchten Spezies ist, wird der Kalziumbedarf der Kapazitierung kontrovers diskutiert. Bereits 1974 konnten Yanagimachi & Usui zeigen, daß die zwei Prozesse Kapazitierung und AR experimentell getrennt werden müssen, um deren unterschiedlichen Bedingungen und Voraussetzungen definieren zu können. Diese klare Trennung fehlt in vielen bis heute bekannten Studien, auch für die bisher untersuchten Primatenspermatozoen.

## 1.8 Faktoren, die die Kapazitierung und AR *in vitro* beeinflussen

Nachdem nun der Weg des Spermatozoons von der Spermiogenese im Hoden bis zur die Verschmelzung mit der Oocyte vorbereitenden Akrosomreaktion beschrieben wurde, soll im folgenden auf Faktoren eingegangen werden, die Teilereignisse dieses Weges *in vitro* beeinflussen können.

Eine Vielzahl von Studien zeigt, daß vor allem die Kapazitierung *in vitro* durch unterschiedlichste Faktoren beeinflusst werden kann. Dazu gehören unter anderem verschiedene Ionen (Kalzium, Karbonat, Natrium u.a.), Albumin, Heparin, zyklisches Adenosinmonophosphat und Coffein. Die Zusammenhänge zwischen der Kapazitierung und den Wirkungsweisen dieser Faktoren sind weitgehend ungeklärt. Im folgenden sollen einige dieser Faktoren und ihre Wirkung näher beschrieben werden.

### 1.8.1 Albumin

Albumin, ein Eiweiß des Blutserums, wird bei zahlreichen Zellkulturen dem Medium als Proteinquelle zugesetzt. Bereits 1973 konnten Miyamoto & Chang zeigen, daß Serumalbumin auch für die Kapazitierung von Mausspermatozoen und die Fertilisation der Eizellen *in vitro* eine essentielle Komponente ist. Der Anteil humaner Spermatozoen mit induzierter Akrosomreaktion steigt nach der Inkubation mit Serumalbumin vom Rind (engl. *bovine serum albumin*, BSA) um das 4fache im Vergleich zu Inkubation mit Serumzusatz (Calvo et al., 1993). Die Funktion des Albumins besteht unter anderem im Austausch von Fettsäuren auf der Spermatozoenoberfläche (Davis et al., 1979). Durch diesen Austausch wird die Spermatozoenmembran destabilisiert, ein Ereignis der Kapazitierung. Eine weitere Funktion ist vermutlich die Entfernung von Cholesterol von der Spermatozoenoberfläche (Visconti & Kopf, 1998). Hamsterspermatozoen sind allerdings auch nach der Kapazitierung in BSA-freiem Medium zur Befruchtung von Eizellen fähig (Uto & Yamahama, 1996). Verschiedene neuere Arbeiten zeigen, daß Albumin auch entscheidend ist für die mit der Kapazitierung assoziierte Proteinphosphorylierung (Emiliozzi & Fenichel, 1997; Visconti et al., 1995a).

### 1.8.2 Heparin

Glykosaminoglykane sind die Polysaccharidketten der Proteoglykane, Bausteine des Bindegewebes. Zur Gruppe der Glykosaminoglykane gehört auch Heparin, ein negativ geladenes Polysaccharid, das eine antikoagulierende Funktion hat. Da Heparin große Paralleltäten zu den Glykosaminoglykanen der Sekrete des weiblichen Genitaltraktes aufweist (Parrish et al., 1989) und gleichermaßen die Kapazitierung boviner Spermatozoen *in vitro* induziert (Topper et al., 1999), eignet es sich zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen der Glykosaminoglykane im Rahmen der Kapazitierung von Spermatozoen. Meizel & Turner (1986) zeigten, daß Heparin fähig ist, *in vitro* die Akrosomreaktion bei Hamsterspermatozoen zu induzieren. Dieser induktive Effekt ist für andere Arten nicht nachgewiesen (u.a. Rind: Handrow et al., 1986), allerdings gibt es zahlreiche Hinweise für ein kapazitierungsfördernde Wirkung Heparins auf die Spermatozoen verschiedener Arten (Rind: Miller et al., 1990; Rhesusaffe: Handrow et al., 1984; Oryx-Antilope: Roth et al., 1998). Die Bindung von Heparin



an die Spermatozoenoberfläche ist Voraussetzung für die Wirkung. Handrow et al. (1984) wiesen spezifische Bindungsstellen nach. Spezifische Proteine des Seminalplasmas binden an die Spermatozoenoberfläche und ermöglichen dann die Bindung der Heparinmoleküle (Chandonnet et al., 1990; Sanz et al., 1993). Verschiedene Studien an Rinderspermatozoen versuchen die Wirkungsweise von Heparin aufzuklären. Durch die Inkubation boviner Spermatozoen mit dem Glykosaminoglykan steigt die intrazelluläre Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat cAMP (Parrish et al., 1994). Die Untersuchung von Mahmoud & Parrish (1996) zeigt, daß mit zunehmender Inkubationszeit mit Heparin die Bindungsaffinität zum WGA-Lektin abnimmt. Ein entscheidender Effekt von Heparin auf Spermatozoen ist die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Cordoba et al., 1997). Leclerc et al. (1989) konnten zeigen, daß Heparin die Bindung von Calmodulin, ein kalziumbindendes Protein, an die Membran des Akrosoms hemmt. Und auch die Phosphorylierung von Spermatozoenproteinen wird durch Heparin stimuliert (Galantino-Homer et al., 1997).

### 1.8.3 cAMP und Coffein

Das *second messenger* Molekül zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), das eine Vielzahl von biochemischen und physiologischen Antworten verschiedenster Zellen vermittelt, beeinflusst auch die Kapazitierung von Spermatozoen *in vitro*. Das Nukleotid, das durch die Wirkung der Adenylat-Cyclase (integrales Membranprotein) aus Adenosintriphosphat (ATP) entsteht, vermittelt intrazellulär die Wirkung von Hormonen, ohne das diese selbst in die Zelle transportiert werden müssen (Stryer, 1991). Das Enzym Phosphodiesterase (PDE) spaltet unter der Bildung von Adenosinmonophosphat (AMP) die Phosphodiesterbindung im cAMP-Molekül und inaktiviert damit das *second messenger* Molekül (Stryer, 1991). Ein Inhibitor dieses Enzyms ist Coffein. Da das Botenmolekül selbst kaum membrangängig ist, wird für biologische Studien zur Wirkung des Nukleotids das weniger polare Derivat Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) eingesetzt, das in die Zelle eindringen kann.

Wie in somatischen Zellen werden auch in Spermatozoenzellen verschiedene Prozesse durch das *second messenger* Molekül cAMP vermittelt. Welche Prozesse dazu gehören wird kontrovers diskutiert, unstrittig ist jedoch ein Einfluß auf die Motilität (Visconti et al., 1999).

Bereits 1982 konnten Boatman & Bavister die Kapazitierung *in vitro* von Spermatozoen des Rhesusaffen *Macaca mulatta* durch den Zusatz von dbcAMP und Coffein zum Medium stimulieren. Eine weitere Studie zeigte, daß cAMP und Coffein eine Hyperaktivierung der Makakenspermatozoen bewirkten und diese zur einer Zunahme der Anzahl befruchteter Eizellen im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (Boatman & Bavister, 1984). Verschiedene Untersuchungen an Makakenspermatozoen zeigen einen deutlichen Einfluß der Inkubation mit dbcAMP und Coffein auf die Motilität (VandeVoort et al., 1994), die Induktion der AR durch die *Zona pellucida* (Tollner et al., 1995) und die Zahl der penetrierten Spermatozoen pro Eizelle (Mahony et al., 1996).

Unter anderem in humanen Spermatozoen wird die Phosphorylierung verschiedener Proteine durch cAMP stimuliert (Leclerc et al., 1996). Durch die Inkubation mit Phosphodiesterase-

Inhibitoren steigt der Grad der Phosphorylierung verschiedener Spermatozoenproteine. Auch in Rinder- (Galantino-Homer et al., 1997) und Mausspermatozoen (Visconti et al., 1995b) wird die Phosphorylierung durch cAMP reguliert. Durch die Inkubation von Makakenspermatozoen mit dbcAMP und Coffein steigt der Grad der Phosphorylierung verschiedener Geißelproteine (Mahony & Gwathmey, 1999). Diese Arbeit sowie eine Studie an Hamsterspermatozoen (Visconti et al., 1999) zeigen, daß durch die cAMP-vermittelte Phosphorylierung in erster Linie Proteine aktiviert werden, die in die Expression der Hyperaktivierung involviert sind.

#### 1.8.4 Kalzium

Wie bereits oben beschrieben, spielt das Ion Kalzium eine zentrale Rolle bei der Steuerung zahlreicher Prozesse in Spermatozoenzellen. Somit wird extrazelluläres Kalzium zu einem entscheidenden Faktor, der die Kapazitierung beeinflusst. Untersuchungen an verschiedenen Spezies zeigten, daß Kalzium für die Akrosomreaktion obligat ist, für die Kapazitierung *in vitro* aber bei einigen Spezies als fakultativ bezeichnet werden kann (u.a. Meerschweinchen: Hyne & Garbers, 1979; Maus: Miyamoto & Ishibashi, 1975). Yanagimachi & Usui (1974) konnten für Spermatozoen des Meerschweinchens eindeutig zeigen, daß ohne Kalzium im Medium die Kapazitierung, aber nicht die Akrosomreaktion möglich ist. Da viele Protokolle jedoch keine eindeutige Trennung der Ereignisse der Kapazitierung von denen der AR bezüglich des Kalziumbedarfes vornehmen, ist es schwierig, diese Frage allgemeingültig und auch artvergleichend zu beantworten.

Verschiedene Studien charakterisieren den Einfluß von Kalzium auf kapazitierungs-assoziierte Prozesse *in vitro*. In Eberspermatozoen inhibiert Kalzium die mit der Kapazitierung assoziierte Phosphorylierung verschiedener Proteine (Kalab et al., 1998). Dies gilt auch für humane Spermatozoen (Luconi et al., 1996; Emiliozzi & Fenichel, 1997). Entscheidend ist Kalzium dagegen für die Hyperaktivierung von Spermatozoen (Davis, 1978). Eine Studie an Mausspermatozoen zeigte, daß für die kapazitierungs-assoziierte Änderung der CTC-Muster die Inkubation in einem kalziumhaltenden Medium Voraussetzung ist (Fraser & McDermott, 1992). DasGupta et al. (1993) konnten gleiches für humane Spermatozoen belegen, Kaul et al. (1997) für Ziegenspermatozoen. Damit wird die Diskussion um den Einfluß von Kalzium kontrovers – einige Prozesse der Kapazitierung oder aber ihre Nachweismethoden scheinen Kalzium zu benötigen, andere dagegen nicht.

Betrachtet man die nächsten Schritte in der Kaskade der Befruchtungereignisse so zeigten Harkema et al. (1998), daß die Etablierung der Bindungsfähigkeit von Eberspermatozoen an die *Zona pellucida* kalziumabhängig ist. Dagegen ist die Zahl gebundener Makakenspermatozoen *in vitro* unabhängig von der Kalziumkonzentration (Tollner et al., 1995).

Die zentrale Bedeutung von Kalzium erklärt sich durch die Vielzahl von Prozessen, in die Kalzium involviert ist, als Botenstoff fungiert. Die membranständige Adenylatzyklase, das wichtigste Enzym der cAMP-Synthese aus ATP, wird z.B. durch Kalzium aktiviert (Visconti et al., 1995b). Auch die Hydrolyse von Phosphoinosit durch die Phospholipase C, ein Schritt der Aktivierungskaskade der Proteinkinase C, wird durch Kalzium stimuliert (Thomas & Meizel,

1988). Und auch das cAMP-spaltende Enzym Phosphodiesterase unterliegt dem Einfluß von Kalzium (Hyne & Garbers, 1979). Durch die Inhibition des Enzymes steigt die cAMP-Konzentration (Leclerc et al., 1998).

#### 1.8.5 Progesteron

Die Betrachtung der Wirkung des Steroids Progesteron auf Spermatozoen verdeutlicht die Notwendigkeit der klaren Trennung zwischen Kapazitierung und Akrosomreaktion zur Charakterisierung der Physiologie von Spermatozoen *in vitro*. Während die akrosomreaktions-induzierende Wirkung von Progesteron für alle bisher untersuchten Spezies eindeutig bewiesen ist (Mensch: Osman et al., 1989; Hamster: Llanos et al., 1993; Pferd: Cheng et al., 1998), wird der Einfluß auf Prozesse der Kapazitierung *in vitro* in jüngerer Zeit kontrovers diskutiert. Die Arbeiten von Tesarik et al. (1993) und auch von Luconi et al. (1995) zeigen für humane Spermatozoen, daß die Phosphorylierung von Spermatozoenproteinen durch die Inkubation mit Progesteron unterstützt wird. Die Inkubation mit Progesteron in humanen Spermatozoen führt auch zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration während einer Kapazitierung *in vitro* (Krausz et al., 1995). Neuere Arbeiten diskutieren den Einfluß des Steroids auf die Kapazitierung allerdings kritisch, vermuten eher eine chemotaktische Wirkung von Progesteron *in vivo* (Aitken et al., 1996; Blackmore, 1999).

Vermittelt wird die Wirkung des Steroids durch einen nicht-genomischen membranständigen Rezeptor. Der klassische Mechanismus zur Vermittlung der Wirkung von Steroiden über die Bindung an die DNA als Transkriptionsfaktor war für die ausgereifte Spermatozoenzelle nicht vorstellbar. Nachdem neben Castilla et al. (1995) auch verschiedene andere Autoren trotz der eindeutigen Wirkung von Progesteron auf die Spermatozoenzelle nicht in der Lage waren, einen genomischen Rezeptor nachzuweisen, begann die Suche nach Bindungsstellen auf der Oberfläche der Spermatozoen (reviewed in Revelli et al., 1994). Der membranständige Rezeptor, durch den die Wirkung von Progesteron auf die Spermatozoenzelle vermittelt wird, konnte inzwischen detektiert werden (Pferd: Cheng et al., 1998).

Als Bestandteil der Follikelflüssigkeit und Sekretionsprodukt der Kumuluszellen spielt Progesteron vermutlich eine zentrale Rolle in der Interaktion von Spermatozoon und Eizelle, in dem u.a. die Motilität der Spermatozoen stimuliert, die Reaktivität des Akrosoms erhöht und die Viabilität der Spermatozoen unterstützt wird (reviewed in Revelli et al., 1994).

#### 1.8.6 Sekrete des weiblichen und männlichen Genitaltraktes

*In vivo* findet die Kapazitierung im weiblichen Genitaltrakt statt und die Betrachtung des Einflusses einzelner Faktoren auf Kapazitierung und/oder Akrosomreaktion wird damit fast unmöglich. Das Ejakulat, bestehend aus den im Nebenhoden gereiften Spermatozoen und den Sekreten der akzessorischen männlichen Geschlechtsdrüsen (kurz: Seminalplasma), gelangt mit der Verpaarung in den weiblichen Genitaltrakt, der ebenfalls ein sekretorisch aktives Organ ist. Das sowohl durch weibliche Sekrete als auch durch das Seminalplasma verschiedene Schritte des Befruchtungsprozesses beeinflußt werden, zeigt u.a. die Arbeit von Huyser et al. (1997). Während das Seminalplasma eher eine hemmende oder verzögernde Aufgabe hat

(Mortimer et al., 1998), werden durch die Sekrete des Ovidukts die Prozesse der Kapazitierung stimuliert (Menezo & Guerin, 1997).

Tomes et al. (1998) konnten z.B. zeigen, daß die Behandlung von humanen Spermatozoen mit Seminalplasma *in vitro* die kapazitierungs-assoziierte Proteinphosphorylierung hemmt. Die inhibierende Wirkung des Seminalplasmas wird den sogenannten Dekapazitierungsfaktoren zugeschrieben (Dukelow et al., 1966), die unter anderem kapazitierungs-assoziierte Veränderungen auf der Spermatozoenoberfläche verhindern. Auch die Bindung von humanen Spermatozoen an die *Zona pellucida* wird durch Seminalplasma gehemmt, durch die Inkubation mit Follikelflüssigkeit wird dieser Schritt der Befruchtung jedoch unterstützt (Hyser et al., 1997). Auch bei Rinderspermatozoen wird die Bindungsaffinität zur *Zona pellucida* durch die Inkubation mit Eileiterflüssigkeit gesteigert (Topper et al., 1999). Miska et al. (1994) konnten in humaner Follikelflüssigkeit ein Protein detektieren, daß die Induktion der Akrosomreaktion unterstützt.

Diese Arbeiten zeigen, daß die Exposition der Spermatozoen zu den verschiedenen Sekreten sowohl die Kapazitierung als auch die Akrosomreaktion beeinflussen. Daher ist für Untersuchungen der Physiologie von Spermatozoen *in vitro* entscheidend, durch welche Methoden die Proben gewonnen wurden, zu welchen Sekreten die Spermatozoen exponiert waren.

### **1.9 Kenntnisstand bei Primaten**

Der hier gegebene Überblick über die kapazitierungs-assoziierten Ereignisse und die beeinflussenden Faktoren verdeutlicht die Komplexität der Kapazitierung. Vermutlich liegt hier auch die Begründung für den zum Teil nur sehr restriktiven Stand der Erkenntnisse.

Desweiteren macht der Überblick deutlich, daß die Kenntnisse über die Kapazitierung, Bindung der Spermatozoen an die Eizelle und Akrosomreaktion vorrangig für humane sowie für Nutztierspermatozoen vorliegen. Weitaus weniger Informationen sind über diese Prozesse bei nicht-menschlichen Primaten verfügbar. Und das, obwohl bereits seit einigen Jahren ein wachsendes Interesse am Einsatz von Primaten in der Etablierung von assistierten Reproduktionstechnologien besteht und diese die genaue Kenntnis der Physiologie der Spermatozoen *in vitro* voraussetzen.

Die Morphologie der Spermatozoen nicht-humaner Primaten, die weitgehend der menschlichen Spermatozoen entspricht, wurde inzwischen für verschiedene Primatenspezies untersucht und auch verglichen (Bedford, 1974). Moore et al. (1984) konnten zeigen, daß die Morphologie der Spermatozoen des Weißbüschelaffen dem bekannten Grundschema folgt und auch die Veränderungen der Oberflächenstruktur während der epididymalen Reifung vergleichbar sind mit den bei anderen Primatenarten beobachteten. Auch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen während der Reifung im Nebenhoden zeigte, daß die Veränderungen der Spermatozoenoberfläche während der Passage durch die Epididymis denen anderer Primatenspermatozoen entsprechen (Kumar & Phillips, 1991).

Wesentlich weniger detailliert und vergleichend zwischen den Primatenspezies sind die Kenntnisse über die Beeinflussung der Befruchtungsfähigkeit *in vitro* von Spermatozoen nicht-humaner Primaten. Zahlreiche Untersuchungen liegen vor für Spermatozoen verschiedener zu den Altweltaffen (*Catarrhini*) gehörenden Makakenarten, da diese dem Menschen relativ nah verwandten Arten als Modell für Studien zur Zellbiologie der Fertilisation schon seit einigen Jahren näher untersucht werden. Bereits 1982 wurde der befruchtungsfördernde Einfluß von cAMP und Coffein auf die Spermatozoen des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) beschrieben (Boatman & Bavister), der in folgenden Studien näher charakterisiert wurde (Bavister et al., 1983; Boatman & Bavister, 1984). Weiterführende Studien an dieser Spezies und der Vergleich mit Spermatozoen von *Macaca fascicularis* zeigten, daß die befruchtungsfördernde Wirkung des Nukleotids in erster Linie in der Induktion der Kapazitierung *in vitro* liegt (Vandevoort et al., 1992; Vandevoort et al., 1994; Mahony et al., 1996) und somit z.B. die Fusion mit zona-freien Hamstereizellen ermöglicht (VandeVoort & Overstreet, 1996). Die bereits erwähnte Untersuchung der kapazitierungs-assoziierten Proteinphosphorylierung bestätigte den kapazitierungs-fördernden Effekt von cAMP und Coffein auf die Spermatozoen von *Macaca fascicularis* (Mahony & Gwathmey, 1999). Eine Studie der Energiequellen, die für eine *in vitro* Kapazitierung der Spermatozoen von *Macaca fascicularis* notwendig sind, zeigte, daß Spermatozoen dieser nicht-humanen Primaten wie menschliche Spermatozoen und im Gegensatz zu Spermatozoen vieler anderer Säuger während der Kapazitierung nicht auf externe Energiequellen angewiesen sind (VandeVoort & Overstreet, 1995). Die Autoren begründen damit auch die Eignung der Makakenspermatozoen als Modell für Studien zur Physiologie menschlicher Spermatozoen. Diese Eignung als Modell treibt die Untersuchungen der Makakenspermatozoen voran.

Chan et al. (1982) zeigten, daß auch die Inkubation der Spermatozoen des Totenkopffaffen *Saimiri sciureus* mit cAMP zu einer Erhöhung der Befruchtungsrate führt (90 %), jedoch wurden auch in der unbehandelten Kontrollgruppe 60 % der Eizellen befruchtet und reiften davon 27,5 % zum Zwei-Zell-Stadium (mit cAMP 32,4 %). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß es innerhalb der Primatenarten deutlich Unterschiede in der *in vitro* Physiologie der Spermatozoen gibt und nicht in allen Spezies eine Induktion der Kapazitierung mittels cAMP notwendig ist.

Neben dieser Studie an Spermatozoen eines Vertreters der Neuweltaffen (*Platyrrhini*) zeigten Kholkute et al. (1990) für die gleiche Spezies *Saimiri sciureus*, daß die Akrosomreaktion *in vitro* nur in der Präsenz von Kalzium induziert werden kann. Auch wurden hier erstmals die Bedingungen für eine *in vitro* Kapazitierung der Spermatozoen eines Neuweltaffen näher charakterisiert.

Weitere Untersuchungen zu Spermatozoen von Neuweltaffen sind spärlich. Yeung et al. (1996) zeigten in einer Studie an epididymalen Spermatozoen des Neuweltaffen *Callithrix jacchus*, daß die Entwicklung der Motilität während der Passage durch den Nebenhoden dem gleichen Muster unterliegt wie die Spermatozoen des Altweltaffen *Macaca fascicularis*. Ein Vergleich der Bindungsfähigkeit an salz-gelagerte humane Eizellen von Spermatozoen der gleichen Spezies (gewonnen durch Elektroejakulation) mit humanen Spermatozoen bestätigt auch hier,

daß die Bindungsaffinität der Spermatozoen dieses Neuweltaffen der der humanen Spermatozoen entspricht (Liu et al., 1991).

Informationen über den Verlauf und die Bedingungen der Kapazitierung *in vitro*, über die Bindung an homologe Eizellen und die Induktion der Akrosomreaktion fehlen allerdings vollständig. Und das, obwohl bereits 1988 Studien zur *in vitro* Fertilisation (IVF) mit *Callithrix jacchus* durchgeführt wurden (Lopata et al., 1988).

### **1.10 Das Untersuchungsobjekt**

Der Weißbüschelaffe *Callithrix jacchus* gehört zu den Callitrichiden (Krallenaffen), eine Familie in der Gruppe der Neuweltaffen. Das natürliche Habitat der Weißbüschelaffen ist der Regenwald an der Nordostküste Brasiliens. Die Tiere leben in Gruppen von 3 bis 15 Tieren, sind tagaktiv und ernähren sich von Früchten, Baumsäften aber auch tierischer Beute. Mit einem mittleren Körpergewicht von 230 bis 260 g gehört *Callithrix jacchus* zu den kleineren Vertretern in der Gruppe der Krallenaffen. Die Geschlechtsreife erreichen die Tiere in einem Alter von 12 bis 17 Monaten. Die Kenntnisse über das Paarungssystem der Weißbüschelaffen im Freiland sind ungenau, beobachtet wurden sowohl Gruppen mit 1 Männchen und mehreren geschlechtsreifen Weibchen, als auch Gruppen mit 1 Weibchen und mehreren geschlechtsreifen Männchen.

In der bio-medizinischen Forschung hat der Weißbüschelaffe aus verschiedenen Gründen großes Interesse geweckt. Mit 28 Tagen entspricht der ovarielle Zyklus der Weibchen nahezu dem des Menschen. Aufgrund dieser Ähnlichkeit zum Menschen und der relativ einfachen Haltung der Tiere in Gefangenschaft werden sie seit nunmehr fast 20 Jahren in der Grundlagenforschung u.a. zu Untersuchungen über die endokrinologische Steuerung der Follikelentwicklung, die hormonellen Regulationen im Uterus aber auch neue Prinzipien der Kontrazeption eingesetzt. Da eine Weiterentwicklung dieser Untersuchungen nicht länger auf den Einsatz assistierter Reproduktionstechnologien verzichten kann, ist die Entwicklung entsprechender Protokolle zur Gewinnung und Aufbereitung von Spermatozoen unabdingbar geworden. Diese Entwicklung setzt jedoch die Kenntnis der Physiologie der Spermatozoen und der Bedingungen für eine erfolgreiche Kapazitierung *in vitro* voraus.

### **1.11 Ziele dieser Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung der Kapazitierung und der Akrosomreaktion des Spermatozoons des Weißbüschelaffen *in vitro*. Diese Daten dienen einerseits der Erweiterung des Grundlagenwissens über die Faktoren, die die männliche Reproduktion *in vivo* und *in vitro* beeinflussen und tragen zum Verständnis artspezifischer Unterschiede in der Spermatozoenphysiologie bei. Vor allem für einen Vergleich dieser Ereignisse innerhalb der Gruppe der Primaten ist die genaue Kenntnis der Physiologie der Spermatozoen eines Vertreters der Neuweltaffen entscheidend. Andererseits ermöglichen die Ergebnisse die Etablierung von Protokollen für die Präparation von Samenproben für verschiedene assistierte Reproduktionstechniken für *Callithrix jacchus*.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit in drei im folgenden näher beschriebenen Abschnitten die Spermatozoen des Weißbüschelaffen studiert.

### Erster Abschnitt

Der erste Abschnitt diente dazu, die Kapazitierung *in vitro* generell zu charakterisieren und den Einfluß der Gewinnungsmethode und der Kapazitierungsförderer Heparin und cAMP in Kombination mit Coffein zu untersuchen. Dabei wurde die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion als Parameter zur Charakterisierung einer erfolgreichen Kapazitierung *in vitro* benutzt.

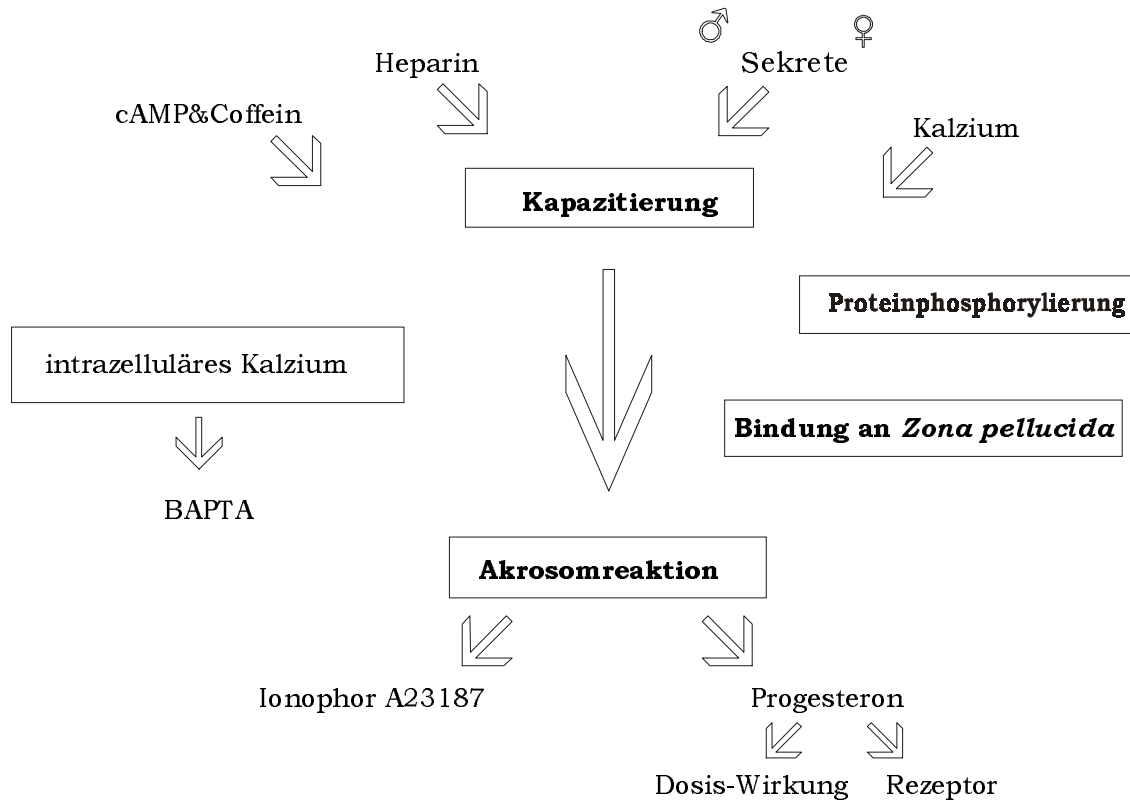
### Zweiter Abschnitt

Aufgrund der bereits beschriebenen Bedeutung von Kalzium für Kapazitierung und Akrosomreaktion sollte im zweiten Abschnitt die Wirkung dieses Ions detailliert untersucht werden. Deshalb wurden hier drei bedeutende Ereignisse während der Reifung der Spermatozoen und der Befruchtung der Eizelle bezüglich ihres Kalziumbedarfs näher charakterisiert: die Proteinphosphorylierung, die Bindung der Spermatozoen an die *Zona pellucida* sowie die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion. Abschließende Untersuchungen zur Charakterisierung des Kalziumbedarfs galten der Induktion der Akrosomreaktion durch den physiologischen Induktor Progesteron sowie der Expression des Rezeptors in Abhängigkeit von extrazellulärem Kalzium.

### Dritter Abschnitt

Im letzten Abschnitt der Arbeit sollte ein Erklärungsansatz für die Bedeutung von Kalzium gefunden werden. Diese Untersuchungen befaßten sich mit der Bindung des intrazellulären Kalziums durch einen intrazellulären Chelatbildner, um so den Einfluß von intrazellulärem Kalzium beurteilen zu können.

Die Graphik in Abb. 4 soll schematisch zeigen, welche Faktoren und welche Prozesse in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit betrachtet wurden.



**Abb.4** Schema der Arbeit



## 2. Material & Methoden

### Spermatozoensammlung, Präparation & Etablierung grundlegender Methoden

#### 2.1 Versuchstiere

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Weißbüschelaffen *Callithrix jacchus* gehörten zur Kolonie des Deutschen Primatenzentrums GmbH, Göttingen, die ausschließlich für Untersuchungen der Abteilung Reproduktionsbiologie gehalten werden. Die Haltung der Tiere erfolgte in Paaren oder Familienverbänden unter konstanten Temperatur- (24°C) und Lichtbedingungen (Licht:Dunkel 12h:12h) in genormten Käfigen (1,0 x 0,5 x 0,8 m). Die Grundausstattung dieser Käfige bestand aus einer metallenen Schlafbox und zwei hölzernen Sitzstangen. Zur Beschäftigung der Tiere wurden in unregelmäßigen Abständen Pappkartons oder Zellstoffballen mit versteckten Leckerbissen (Mehlwurmlarven, Zwieback u.a.) in den Käfig gehängt. Gefüttert wurden die Tiere mit Pellets (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser *ad libitum* sowie zusätzlich mehrfach pro Woche mit Obst, Gemüse, gekochtem Hühnerfleisch, Reis, Nudeln und Brot.

Das Alter der untersuchten Tiere lag zwischen 2 und 10 Jahren. Die in dieser Untersuchung verwendeten Tiere wogen zwischen 320 und 580 g.



**Abb. 5** Weißbüschelaffen *Callithrix jacchus*

Die Gewinnung von Eizellen sowie die Vermeidung von Trächtigkeiten machte in der vorliegenden Arbeit die Überwachung des ovariellen Zykluses der weiblichen Weißbüschelaffen erforderlich. Zu diesem Zweck wurde den Weibchen 1 bis 2 Mal pro Woche 0,1 – 0,2 ml Blut aus der *Vena femoralis* entnommen, um anhand der Progesteronkonzentration im Plasma den ovariellen Status zu bestimmen. Trächtigkeit wurde durch die intramuskuläre Injektion von 0,8 µg Cloprostenol (Estrumate; Pitman-Moore, Burgwedel, D) am Tag 12 bis 16 nach Ovulation verhindert. Das Analogon des Prostaglandins PGF<sub>2α</sub> induziert die Luteolyse

(Summers et al., 1985). Diese Beeinflussung des Zykluses war auch die Voraussetzung für die Eizellgewinnung bei allen Tieren im gleichen Zyklusstadium.

## 2.2 Spermatozoengewinnung

Im Verlauf der Arbeit wurden Spermatozoen von insgesamt 22 Männchen untersucht. Im Folgenden sind die drei verwendeten Gewinnungsmethoden beschrieben.

### 2.2.1 penile Vibrostimulation (PVS)

Die Gewinnung natürlich ejakulierter Samenproben erfolgte durch die Methode der penilen Vibrostimulation nach Yeoman et al. (1998) mit Modifikationen nach Küderling et al. (1999, submitted) und Schneiders (unpublished). Es wurden Ejakulate von 9 männlichen Weißbüschelaffen in einem Alter von 4 bis 10 Jahren gewonnen. Sieben Tiere hatten im Rahmen der Zucht Nachkommen gezeugt. Über die Fertilität der verbleibenden 2 Tiere lagen keine Kenntnisse vor. Die Männchen wurden zunächst für 24 Stunden von ihrer jeweiligen Partnerin getrennt. Die Sammlung der Samenproben erfolgte mittels des für humane Zwecke entwickelten Vibrostimulators „FertiCare personal“ (Multicept ApS, Rungsted, Denmark), durch den ein Glasröhren ( $\varnothing$  4-5 mm) mit Kontakt zum Penis in bestimmten Frequenzen und Amplituden in Vibrationen versetzt wurde. Die durch diesen Reiz ejakulierte Samenprobe wurde im Glasröhren aufgefangen, dieses mit Parafilm verschlossen und bis zur weiteren Analyse bei 37°C in einem Wärmeblock aufbewahrt.



**Abb. 6** penile Vibrostimulation (engl.: penile vibratory stimulation; PVS)

**links:** Fixierung des unseidierten Tieres auf dem stoffbespannten Gestell

**rechts:** Positionierung des Vibrators mit Glasröhren

### 2.2.2 Vaginalspülung (engl. *vaginal washing*; VW)

Natürlich ejakulierte Samenproben wurden von 12 männlichen Weißbüschelaffen durch die Methode der Vaginalspülung nach Küderling et al. (1995) gesammelt. Die Männchen waren in

einem Alter von 4-10 Jahren, von 10 Tieren war die Fertilität durch Zeugung von Nachkommen im Rahmen der Zucht bewiesen (siehe Tabelle im Anhang). Die eingesetzten Weibchen waren in einem Alter von 5-10 Jahren und bis auf eine Ausnahme ovariectomiert. Zur Sammlung der Samenproben wurden die Paare zunächst für 24 bis 72 Stunden getrennt, wobei das Männchen mit Sichtkontakt zum Weibchen in einem kleinen Käfig (0,5 x 0,5 x 0,8 m), der vor dem Haltungskäfig hing, gehalten wurde. Durch diese Trennung wurden zum einen unbeobachtete Kopulationen verhindert, zum anderen die Kopulationsbereitschaft des Männchens zum Sammlungszeitpunkt erhöht. Die Trenndauer war vom Männchen abhängig, da bei einigen Tieren diese Kopulationsbereitschaft erst nach längerer Trennung eintrat. Zum Sammlungszeitpunkt wurde das Männchen in den Käfig des Weibchens entlassen. Die Kopulation war innerhalb weniger Sekunden zu beobachten. Im Anschluß wurde das Weibchen sofort aus dem Käfig genommen, in der Hand eines Helfers fixiert und die Vagina mittels einer 1 ml Plastikpipette (Neolab), deren Spitze mit einem 1,5 cm langen flexiblen Plastikschlauch versehen war, mit 2 x 100 µl steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pNaCl, siehe Anhang) gespült (siehe Abb. 7).



**Abb. 7** Vaginalspülung nach der Kopulation (engl.: *vaginal washing*; VW)

**links oben:** Fixierung des Weibchens, Gabe von Leckerbissen zur Belohnung

**links unten:** Position des Weibchens während des Spülvorgangs

**rechts oben:** Positionierung der Pipette während des Spülers

**rechts unten:** Überführen der Spüllösung in ein Eppendorf-Cup.

Die das Ejakulat enthaltende Spüllösung wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei 37°C in einem Wärmeblock aufbewahrt.

### 2.2.3 epididymale Spermatozoen

Epididymale Spermatozoen wurden durch die Präparation der Nebenhoden nach Kastration von 8 Männchen im Alter von 2 bis 9 Jahren gewonnen. Die Zeugungsfähigkeit von 2 Tieren war unbekannt, 7 Tiere waren fertil. Zur Kastration durch die Tierärztin des Institutes wurden die Tiere zunächst mittels Injektionsnarkotikum (Mixtur Ketamin und Xylaxin) narkotisiert, während des Eingriffs wurde die Narkose durch das Inhalationsnarkotikum Halothan fortgeführt. Der Hoden wurde sofort nach der Entnahme in ein Röhrchen (Sarstedt) mit 37°C warmem Medium überführt. Dabei handelt es sich um das nach Gilchrist et al. (1997) modifizierte Tyrode's Albumin Laktat Pyruvat (TALP) Medium (ohne Kalzium) mit Hepes zur Stabilisierung des pH bei 7,3 (siehe Anhang).

Die Präparation der Nebenhoden erfolgte nach Yeung et al. (1996) in kleinen Petrischalen (Greiner) in TALP-Medium. Mit feinem Präparationsbesteck wurde der Nebenhoden vom Hoden getrennt und von Fett- und Geweberesten befreit. Nach zweimaligem Waschen in Medium wurde der Nebenhoden in eine frische Petrischale überführt und die Spermatozoen aus Samenleiter und Nebenhodenschwanz in das TALP-Medium ausgedrückt. Wichtig war dabei, daß kein Blut und keine Fettzellen in das Medium gelangen. Das die Spermatozoen enthaltende Medium (2-3 ml) wurde mittels einer Eppendorf-Pipette in ein 4 ml Glasröhrchen überführt und bis zur direkt anschließenden Reinigung bei 37°C in einem Wärmeblock aufbewahrt.

### 2.3 Routinebeurteilung und Präparation der Samenproben

Die wie oben beschrieben gewonnenen Proben wurden einer Routinebeurteilung unterzogen. Dazu wurden zunächst 5 µl der Proben auf einem vorgewärmten Objektträger mit 5 µl des Vitalfarbstoffes Eosin (2 % in bH<sub>2</sub>O, Sigma) vermischt und mit einem Deckgläschen versehen. Mittels des Dunkelfeldmikroskops BH-2 (OLYMPUS) wurde das Verhältnis lebender zu toten Spermatozoen (eosinpositiv) sowie der Anteil motiler Spermatozoen geschätzt. Nur Ejakulate mit mehr als 50 % motilen und mehr als 60 % lebenden Spermatozoen wurden verwendet. Insgesamt ca. 90 % der Ejakulate entsprachen diesen Kriterien. Weitere 5 µl der Samenprobe wurden zur Bestimmung der Spermatozoenzahl 1:20 bis 1:100 (abhängig von der Dichte) in bH<sub>2</sub>O verdünnt. Die zur Zählung benutzte NEUBAUER Kammer wurde pro Seite mit 10 µl der Verdünnung beschickt, nach 1-2 min wurden die Spermatozoen in 3 Großquadraten ausgezählt und der Mittelwert errechnet ( $\bar{x}$ ). Die Kalkulation der Spermatozoendichte erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Dichte (Spermatozoen/ml)} = \bar{x} * \text{Verdünnung} * \text{Kammerfaktor.}$$

Im Anschluß an diese erste Charakterisierung der gewonnenen Samenproben erfolgte die Aufreinigung der Spermatozoen. Eine Besonderheit, die alle im Folgenden beschriebenen Methoden betrifft, war das minimale Volumen der Ejakulate des Weißbüschelaffen von 8 bis

85 µl (Cui et al., 1991; Gewinnung durch Elektroejakulation). Dieses Probenvolumen erforderte deutliche Modifikationen aller in der Spermatozoenforschung bekannter Protokolle. Im Verlauf der Untersuchungen wurden zwei in der Andrologie angewendete Methoden der Spermatozoenaufreinigung verglichen und je nach den Anforderungen der Experimente eingesetzt. Ziele dieser Aufreinigung waren 1.) die Spermatozoen von Medien und Sekreten zu befreien sowie 2.) die Spermatozoendichte zu erhöhen.

### 2.3.1 *swim up*

Die durch VW oder PVS gewonnenen Samenproben wurden in ein 4 ml Glasröhren (Ø 12 mm) überführt und zum Waschen in 500 µl TALP Medium verdünnt. Die epididymalen Spermatozoen wurden ohne weitere Verdünnung wie folgt behandelt. Voraussetzung für die Methode des *swim up*'s ist die Pelletierung der Spermatozoen durch Zentrifugation, bei der einige Besonderheiten zu beachten waren. Benutzt wurde die Spezialzentrifuge „UNIVERSAL 30 RF“ von HETTICH, die eine Verzögerung der Anlaufphase und ein extrem schnelles Abbremsen ermöglicht. Die verzögerte Steigerung der Zentrifugalkraft führte zu einer Minimierung der auf die Spermatozoen einwirkenden Scherkräfte (Müller et al., 1999). Die Verkürzung der Abbremsphase verhinderte das Aufschwimmen der hochmotilen Spermatozoen aus dem Pellet. Zentrifugiert wurden die Proben 10 min bei 1500 rpm (350 x g), wobei die Endgeschwindigkeit durch die Verzögerung erst nach ca. 70 sec erreicht wurde. Zum Stillstand kam der Schwingrotor innerhalb von 10 sec. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet wurde in 100 µl TALP Medium resuspendiert und mit weiteren 100 µl Medium überschichtet. Um den motilen Spermatozoen das Aufschwimmen aus dem Pellet zu ermöglichen, wurde das Glasröhrchen für ca. 60 min erschütterungsfrei bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert. Im Anschluß wurde die Spermatozoendichte im Überstand kontrolliert und dieser für die anschließenden Experimente abgenommen.

### 2.3.2 Dichtegradientenzentrifugation

In einigen Versuchen wurden Medien eingesetzt, die die Motilität der Spermatozoen inhibieren. Da die hohe Beweglichkeit der Spermatozoen jedoch Voraussetzung für die Aufreinigung durch den oben beschriebenen *swim up* ist, mußten die Spermatozoen für diese Experimente mittels einer Dichtegradientenzentrifugation nach Vandervoort et al. (1994) gereinigt werden. Dazu wurde eine 400 µl Säule Percoll vorbereitet, in dem Percoll (Sigma), ein mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVP) beschichtetes Kieselgel, zu gleichen Teilen in TALP Medium verdünnt wurde. Diese Säule wurde mit der Probe (nach der Gewinnung durch VW ca. 200 µl oder nach PVS Ejakulat in 200 µl TALP Medium) überschichtet. Die Probe wurde 15 min bei 1500 rpm (350 x g) durch den Dichtegradienten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet, das nahezu alle Spermatozoen enthielt, wurde in 500 µl TALP Medium resuspendiert. Zur Entfernung von Percollresten wurde die Probe erneut zentrifugiert (5 min bei 1500 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet im jeweiligen Testmedium resuspendiert.

### 2.3.3 Präparation humaner Spermatozoen

Verschiedene Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden bereits an humanen Spermatozoen durchgeführt. Daher konnten in einigen ausgewählten Versuchen humane Spermatozoen zur Kontrolle verschiedener etablierter Protokolle eingesetzt werden. Die Gewinnung erfolgte bei freiwilligen Spendern durch Masturbation nach 2 bis 3 Tagen sexueller Abstinenz. Die Proben wurden entsprechend den Empfehlungen der WHO (WHO handbook, 1995) aufbereitet; zunächst wurden die Proben 30 min bei 37 °C inkubiert, um eine Verflüssigung des Koagulums zu ermöglichen. Die Trennung der Spermatozoen vom Seminalplasma wurde mittels der unter 3.2 beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation erzielt. Dazu wurde ca. 1 ml Ejakulat auf eine 2 ml Percoll-Säule (50 % in TALP) gelegt und 15 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl TALP resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation (10 min bei 1500 rpm) wurde das die Spermatozoen enthaltende Pellet entsprechend den jeweiligen Versuchsprotokollen in Testmedium resuspendiert.

## 2.4 Charakterisierung von Viabilität und Akrosomzustand

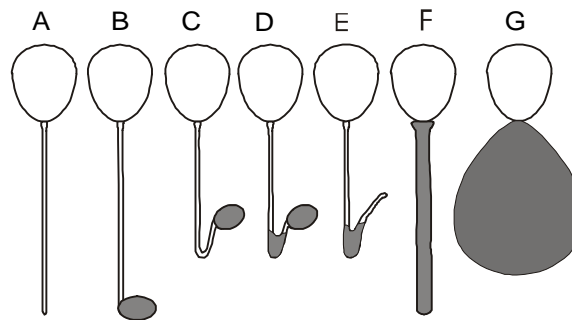
### 2.4.1 Methoden zur Erfassung der Viabilität

Um die geeignete Methode zur Detektion lebender bzw. toter Spermatozoen zu finden, wurden drei in der Literatur beschriebene Protokolle modifiziert und getestet. Verglichen wurden ein Test zur Membranintegrität mit zwei Fluoreszenzfärbungen, bei denen ein Fluoreszenzsignal tote Spermatozoen markiert. Vorteile der Fluoreszenzfärbung sind die hohe Spezifität sowie die relativ einfache Handhabung.

#### 2.4.1.1 Hypo-osmotischer Schwellungstest (nach WHO)

Ein wesentliches Merkmal fertiler Spermatozoen ist eine intakte Membran, an der zahlreiche Stoffwechselprozesse stattfinden und die auch Voraussetzung für eine erfolgreiche Fusion des Spermatozoons mit der Eizelle ist. Die Membranintegrität ist also ein wesentlicher Parameter für die Beurteilung von Spermatozoen. Die Methode des hypo-osmotischen Schwellungstests beruht darauf, daß lebende Spermatozoen mit intakter Membran unter hypo-osmotischen Bedingungen durch den Einstrom von Wasser anschwellen (Jeyendran et al., 1984).

Zur Detektion lebender Spermatozoen wurden 50 µl Spermatozoensuspension in einem Eppendorf-Cup mit 500 µl *swelling solution* nach WHO handbook, 1995 (siehe Anhang) gemischt, die vorher auf 37°C erwärmt wurde. Das Gemisch wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Spermatozoen auf einem Objektträger ausgestrichen. Die Beurteilung der Spermatozoen erfolgte im Phasenkontrastmikroskop „BH2“ (OLYMPUS) bei 200 – 400facher Vergrößerung. Dabei wurden die Spermatozoen in die in Abb. 8 gezeigten Kategorien eingeteilt.



**Abb. 8** Muster nach swelling test : A totes Spermatozoon  
B – G lebende Spermatozoen

#### 2.4.1.2 Fluoreszenzfärbung mit Propidiumjodid (PI)

Propidiumjodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die Nukleinsäuren der zellulären DNA bindet. Die Membran von Zellen ist nicht permeabel für den Fluoreszenzfarbstoff, so daß er nur in geschädigten Zellen an die DNA binden kann. Durch die Bindung des Fluorochroms an die DNA entsteht nach Anregung mit einer Wellenlänge von 520 nm ein langwelliges Fluoreszenzsignal (610 nm). Somit ist das rote Fluoreszenzsignal ein Merkmal toter Zellen. Die Färbung mit Propidiumjodid (Sigma) erfolgte in Suspension nach Centola et al. (1990). Eine 50 µl große Probe Spermatozoen in Testmedium wurde mit 1 µl PI (Stamm 500 µg/ml) versetzt, so daß die Endkonzentration des Farbstoffes 10 µg/ml betrug. Nach 2 min Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde der überschüssige Farbstoff ausgewaschen. Dazu wurde die Probe mit 500 µl pNaCl versetzt und anschließend 5 min bei 500 x g in der Eppendorf Zentrifuge „5314R“ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in ca. 10 µl pNaCl resuspendiert und die Spermatozoen auf einem in Ethanol gereinigten Objektträger ausgestrichen. Der Objektträger wurde mindestens 1 h im Dunkeln bei 37 °C getrocknet und anschließend mit dem Eindeckmedium Citifluor® AF2 (Plano, Cappel), das das Ausbleichen der Fluoreszenz verhindert, versiegelt. Die Detektion PI-positiver Spermatozoen (tot) erfolgte per Mikroskopie am AXIOPHOT (ZEISS) mit dem UV-Filter-Satz No. 00 (Anregungsfilter 530 –585 nm Sperrfilter 615 nm).

#### 2.4.1.3 Fluoreszenzfärbung mit Höchst 33258

Auch das Fluorochrom Höchst 33258 bindet an die DNA und ist, wie Propidiumjodid, nicht membrangängig. Bei einer Anregung mit 365 nm wird daher von toten Zellen nach der Bindung des Farbstoffes ein Signal mit einer Wellenlänge von 480 nm emittiert. Die Verwendung diese Supravitalfarbstoffes erfolgte nach dem Protokoll von Hinsch et al. (1997). Die Spermatozoen im Testmedium wurden mit dem Vitalfarbstoff Höchst 33258 (Stammlösung 1mg/ml in pNaCl; SIGMA) in einem Eppendorf-Cup versetzt. In der 50 µl Probe betrug die Endkonzentration des Farbstoffes 1µg/ml. Die Proben wurden 10 min im

Dunkeln bei 37°C inkubiert und im Anschluß zum Auswaschen des ungebundenen Farbstoffes mit 1 ml pNaCl verdünnt. Nach der Zentrifugation (5 min bei 3000 rpm) wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 10 µl pNaCl resuspendiert und die Spermatozoen auf einem Ethanol-gereinigten Objektträger ausgestrichen. Der Objektträger wurde vor der weiteren Bearbeitung (weitere Färbung oder Auswertung durch Mikroskopie) mindestens 1 h im Dunkeln bei 37 °C getrocknet. Die Detektion Höchst-positiver Spermatozoen (tot) erfolgte am AXIOPHOT Mikroskop (ZEISS) mit dem UV-Filter-Satz No. 02 von ZEISS (Anregungsfilter 365 nm, Sperrfilter 420 nm).

#### 2.4.2 Erfassung des Akrosomzustandes

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden eingesetzt, um die Kapaziterung der Spermatozoen *in vitro* zu charakterisieren. Die einzelnen Methoden sind im Abschnitt 5. Versuchsprotokolle beschrieben. Ein wesentlicher Parameter zur Charakterisierung einer erfolgreichen Kapaziterung *in vitro* war die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion (AR) als Endpunkt der Kapaziterung (siehe Einleitung).

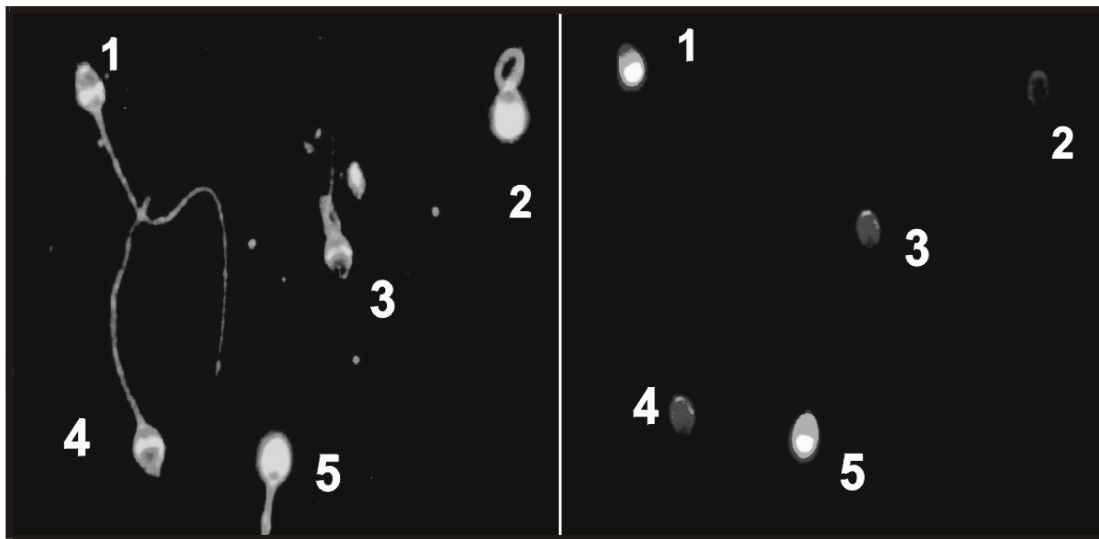
Da nur lebende akrosom-reagierte Spermatozoen von Interesse waren, wurde eine kombinierte Fluoreszenzfärbung nach Cross et al. (1996) und Hinsch et al. (1997) für die Anwendung bei minimalstem Probenvolumen modifiziert.

Für die Darstellung des Akrosoms wurde das Fluorescein-Isotiozyanat (FITC) markierte Agglutinin der Erbse *Pisum sativum* (FITC-PSA) (Sigma) verwendet. Dieses Agglutinin bindet nach vorheriger Permeabilisierung der Membran an die Matrix des Akrosoms und ermöglicht so die Darstellung der Kappe bei nicht-akrosom-reagierten Spermatozoen. Das Fluorochrom Fluorescein-Isotiozyanat emittiert bei einer Anregung mit 490 nm ein Fluoreszenzsignal mit 525 nm. Zunächst wurden die lebend-tot-markierten (siehe 2.4.1.3) und auf einem Objektträger getrockneten Spermatozoen 15 min in Methanol fixiert und die Membranen permeabilisiert, anschließend 2 min vorsichtig in einem indirekten Wasserstrahl gewaschen und bei 37 °C im Dunkeln getrocknet. Die FITC-PSA-Stammlösung (1 mg/ml) wurde in pNaCl auf eine Endkonzentration von 35 µg/ml verdünnt. Die getrockneten Objektträger wurden in einer, durch ein wassergetränktes Tuch feucht gehaltenen Kammer mit jeweils ca. 300 µl der Färbelösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 30 min wieder im Dunkeln. Nach der Färbung wurde die FITC-PSA-Lösung abgekippt und die Objektträger wieder für 10 min im indirekten Wasserstrahl gewaschen. Im Anschluß an diesen Waschgang wurden die Objektträger sofort eingedeckelt. Das dabei verwendete Eindeckmittel Citifluor® AF2 (Plano, Cappel) verhinderte das Ausbleichen der Fluoreszenz.

Zur Markierung toter Spermatozoen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Höchst 33258 (siehe 2.4.1.3) ausgewählt, da mit diesem Farbstoff die Detektion toter Zellen in Verbindung mit dem im Folgenden beschriebenen Marker des Akrosoms die eindeutigsten Ergebnisse lieferte. In der Kombination mit Propidiumjodid als Supravitalfarbstoff erwies sich die Nähe der emittierten Fluoreszenzsignale als problematisch (Propidiumjodid: 610 nm, FITC: 525 nm).



Die Detektion der lebenden (Höchst-negativ) akrosom-reagierten (FITC-PSA-negativ) Spermatozoen erfolgte mit dem AXIOPHOT Mikroskop (ZEISS) bei einer 630fachen Vergrößerung. Höchstmarkierte Spermatozoen wurden mit dem UV-Filter 02 (ZEISS) detektiert (siehe 4.1.3). FITC-PSA-markierte Objekte konnten mit dem UV-Filter No.09 (Anregungsfiler: 450-490 nm, Sperrfilter: 520 nm) beurteilt werden. Pro Objektträger wurden 200 Spermatozoen mittels dieser beiden Filtersysteme in die 4 in Abb. 9 gezeigten Kategorien eingeordnet.



**Abb. 9** Fluoreszenzmuster

**links:** FITC-PSA, **rechts:** Höchst

- 1 - Höchst-positiv(blau) = tot, FITC-PSA-negativ = akrosom-reagiert
- 2 - Höchst-neagitiv = lebend, FITC-PSA-positiv(grün) = nicht akrosom-reagiert
- 3,4 - Höchst-neagitiv = lebend, FITC-PSA-negativ = akrosom-reagiert
- 5 - Höchst-positiv = tot, FITC-PSA-positiv(grün) = nicht akrosom-reagiert

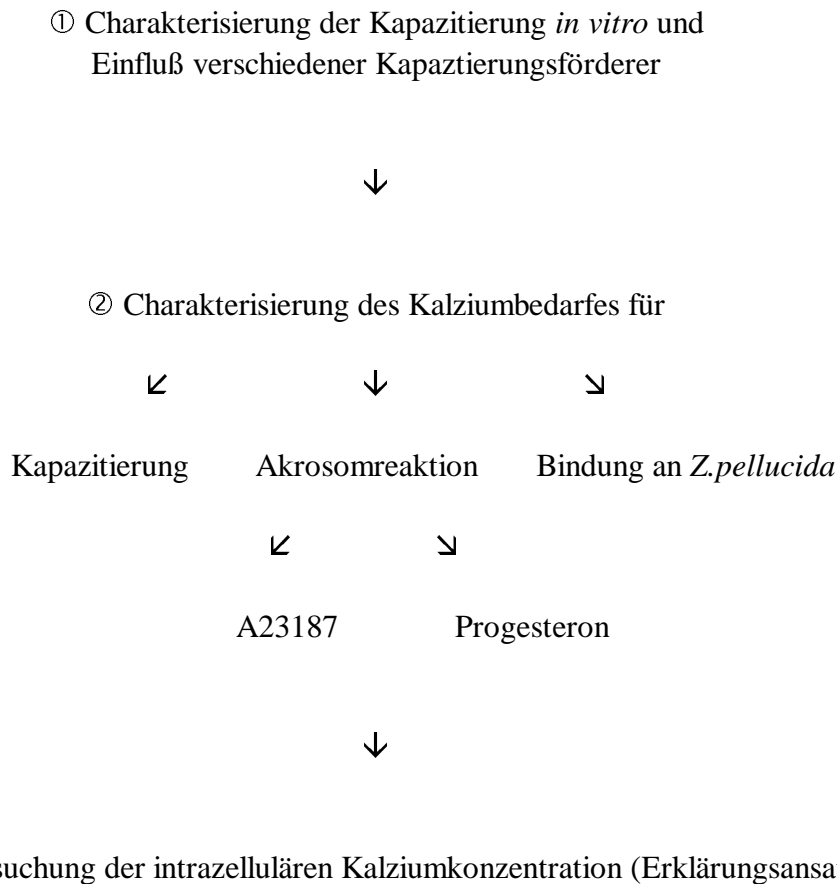
## Untersuchungen zu Kapazitierug und Akrosomreaktion *in vitro*

### 2.5 Versuchsprotokolle

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die erste Charakterisierung der Physiologie des Spermatozoons des Weißbüschelaffen *in vitro*. Dazu mußten zunächst Methoden der Spermatozoenforschung modifiziert und etabliert werden.

Im Anschluß daran erfolgte im ersten Abschnitt dieser Arbeit eine generelle Charakterisierung der Kapazitierug *in vitro* und des Einflusses verschiedener Kapazitierugsförderer. Im Zentrum des zweiten Abschnittes stand der Kalziumbedarf drei bedeutender Ereignisse während der Reifung der Spermatozoen und der Befruchtung: die Proteinphosphorylierug, die Bindung der Spermatozoen an die *Zona pellucida* und die Akrosomreaktion als Endpunkt der Kapazitierug. Abschließende Untersuchungen galten der Induktion der Akrosomreaktion durch den physiologischen Induktor Progesteron sowie der Expression des Rezeptors in Abhängigkeit von extrazellulärem Kalzium.

Im letzten Abschnitt der Arbeit sollte durch die Bindung des intrazellulären Kalziums durch einen intrazellulären Chelatbildner der Einfluß von intrazellulärem Kalzium untersucht werden. Somit ergibt sich eine Dreiteilung der Arbeit, die in Abb. 10 dargestellt ist.



**Abb. 10** Schematischer Aufbau der Arbeit

### 2.5.1 Charakterisierung der Kapazitierung *in vitro* und Untersuchungen zu beeinflussenden Faktoren

Bevor einzelne Kapazitierungsförderer untersucht werden konnten, mußte zunächst die Kapazitierung an sich *in vitro* charakterisiert werden. Dazu wurden die Spermatozoen nach den unter Abschnitt 3. beschriebenen Methoden aufgereinigt, in TALP resuspendiert und bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten von 30 min, 1 h, 2-4 h 5-6 h und 7-8 h wurde je ein 50 µl großes Aliquot abgenommen und der unter Abschnitt 4.2. beschriebenen kombinierten Fluoreszenzfärbung zur Detektion lebender, spontan akrosom-reagierter Spermatozoen unterzogen. Ein weiteres Aliquot wurde 10 min bei 37 °C mit dem Kalziumionophor A23187 (Sigma, Endkonzentration 5 µM) inkubiert. Diese Inkubation diente der Ermittlung der vollständig kapazitierten und daher zur Akrosomreaktion fähigen Spermatozoen. Auch in diesen Proben wurden die lebenden akrosom-reagierten Spermatozoen mit den Fluoreszenzmarkern detektiert.

Im Anschluß an diese Grundcharakterisierung wurde der Einfluß verschiedener aus der Literatur bekannter sogenannter Kapazitierungs-förderer auf die Spermatozoen des Weißbüschelaffen untersucht.

#### 2.5.1.1 Einfluß von Heparin

In verschiedenen Studien u.a. an bovinen Spermatozoen konnte ein Kapazierungs-fördernder Effekt des Glycosaminoglycans Heparin nachgewiesen werden. Um die Bedingungen für eine effektive Kapazierung des Spermatozoen des Weißbüschelaffen zu charakterisieren, wurde der Einfluß von Heparin nach folgendem Protokoll getestet.

Nach Gewinnung, Aufreinigung und Präinkubation der Spermatozoen für 1 h in TALP mit Kalzium (2 mM) wurde die Probe gesplittet und 1 Teil mit einer Heparinstammlösung (20 U/ml) versetzt (Endkonzentration = 1 U/ml), während der zweite Teil ohne Heparin weitergeführt wurde. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Akrosomreaktion mit dem Kalziumionophor A23187 (Sigma) induziert, um durch die Induzierbarkeit der AR eine vollständige Kapazierung zu charakterisieren. Dazu wurden die Proben für 10 min mit dem Ionophor (Endkonzentration 5µM) inkubiert. Im Anschluß an die Induktion erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der lebenden akrosom-reagierten Spermatozoen wie oben beschrieben.

#### 2.5.1.2 Einfluß von cAMP und Coffein

Frühere Arbeiten zeigten, daß die extrazelluläre Zugabe des *second-messenger* Moleküls cAMP und des Phosphodiesterase-Inhibitors Coffein die Kapazierung von Spermatozoen verschiedener Spezies *in vitro* beeinflusst (u.a. Rhesusaffe: Boatman & Bavister, 1984; Javaneraffe: Mahony et al., 1996; Eber: Kalab et al., 1998). In Protokollen für IVF verschiedener Makaken-Arten werden die Spermatozoen vor der Inkubation mit den Eizellen ebenfalls mit cAMP und Coffein behandelt. Aus diesen Gründen sollte auch für die Spermatozoen des Weißbüschelaffen der Einfluß von cAMP und Coffein auf die Kapazierung *in vitro* untersucht werden.

Die Spermatozoen wurden nach der Gewinnung durch VW oder PVS und der Aufreinigung durch *swim up* in TALP-Medium mit Kalzium (2 mM) resuspendiert. Nach 60 min Inkubation wurden die Spermatozoen während der letzten 30 min der Kapazierung mit Coffein und cAMP in einer Endkonzentration von 1 mM bzw. 10 µM bei 38 °C inkubiert. Im Anschluß daran wurde als Marker für eine erfolgreiche Kapazierung die Akrosomreaktion induziert. Die Induktion der AR erfolgte durch 10 min Inkubation mit dem Kalziumionophor A23187 (Sigma, Endkonzentration 5 µM). Im Anschluß daran wurden lebende akrosom-reagierte Spermatozoen durch die unter 4.2 beschriebene Fluoreszenzfärbung markiert und ausgezählt.

#### 2.5.2 Einfluß von extrazellulärem Kalzium

Studien an Spermatozoen verschiedener Spezies zeigten, daß die Konzentration des zweiwertigen Ions Kalzium die Kapazierung *in vitro* beeinflusst (z.B. Yanagimachi & Usui, 1974; Fraser, 1987; Anand, 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluß von Kalzium auf verschiedene Schritte der Spermatozoen zur Befruchtung untersucht.

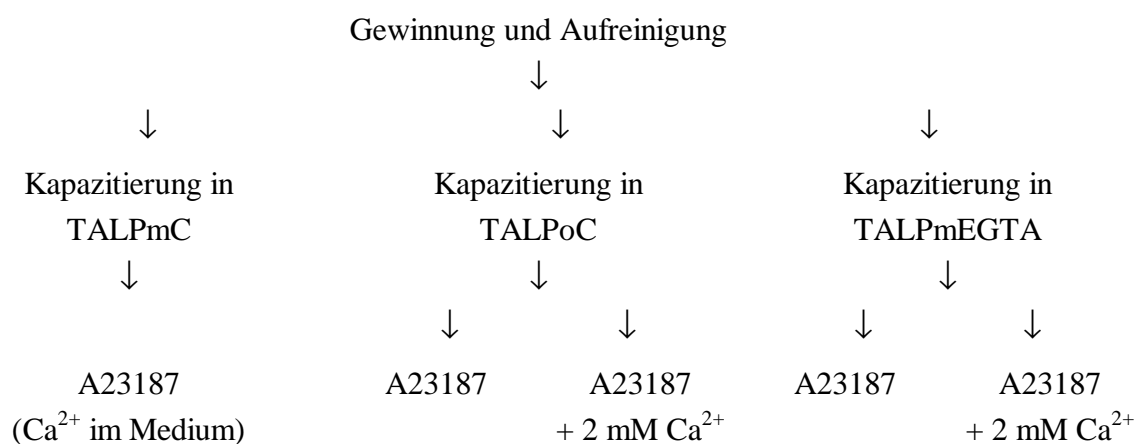
### 2.5.2.1 auf Kapazitiering und Akrosomreaktion

Nach der Gewinnung der Spermatozoen und der Aufreinigung durch *swim up* oder Percoll wurde die Spermatozoenprobe im Testmedium verdünnt. Um den Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf die Kapazitiering zu bestimmen, wurden drei Testmedien verwendet:

- ① TALP mit 2 mM Kalzium (TALPmC)
- ② TALP ohne den Zusatz von 2 mM Kalzium (TALPoC)
- ③ TALP mit 1 mM Ethylen Glycol-bis( $\beta$ -Aminoethyl Ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid (EGTA; Sigma) ohne Kalzium (TALPmEGTA).

In diesen Medien wurden die Proben 2 h zur Kapazitiering inkubiert. Um Unterschiede in der Kapazitiering feststellen zu können, wurde die Akrosomreaktion als Marker für eine erfolgreiche Kapazitiering induziert. Dazu wurde ein Aliquot von 45  $\mu$ l der Spermatozoensuspension in einem Eppendorf-Cup mit 5  $\mu$ l des Kalziumionophor-Stocks (A23187, 50  $\mu$ M) versetzt. Zur Induktion wurden die Proben 10 min bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert. Direkt im Anschluß erfolgte die Markierung lebender akrosom-reagierter Spermatozoen mittels der kombinierten Fluoreszenzfärbung mit den Farbstoffen Höchst 33258 und FITC-PSA.

Da sich die Kapazitiering und die Akrosomreaktion bezüglich des Bedarfes an extrazellulärem Kalzium deutlich unterscheiden können (z.B. Emilliozzi & Fenichel, 1997), mußte für die Untersuchung des Kalziumbedarfes der Spermatozoen des Weißbüschelaffen ein weiteres Protokoll verwendet werden. Nach der oben beschriebenen Inkubation in den 3 verschiedenen Medien TALPmC, TALPoC, TALPmEGTA wurde zeitgleich mit dem Induktor der Akrosomreaktion A23187 ein Kalziumstock zur Probe zugegeben (Endkonzentration = 2 mM). Auf diese Weise konnte der Bedarf für extrazelluläres Kalzium für Kapazitiering und Akrosomreaktion getrennt betrachtet werden. Die Inkubation mit dem Ionophor erfolgte wie zuvor für 10 min bei 37 °C im Wärmeblock. Auch die Detektion toter Spermatozoen mit H33258 wurde direkt im Anschluß durchgeführt.



**Abb. 11** Schematischer Versuchsaufbau

Da aus früheren Studien bereits Kenntnisse über den Kalziumbedarf von humanen Spermatozoen während der Kapazitierung vorlagen (Emiliozzi & Fenichel, 1997), konnte das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll durch den Einsatz humaner Spermien validiert werden.

#### 2.5.2.2 auf die Proteinphosphorylierung

Die Phosphorylierung von Proteinen an der Aminosäure Tyrosin in Abhängigkeit von extrazellulärem Kalzium während der Kapazitierung wurde nach dem im Folgenden beschriebenen Protokoll untersucht.

##### Proteinextraktion

Die Extraktion der Spermatozoenproteine erfolgte auf der Grundlage der bei Emiliozzi & Fenichel (1997) und Aitken et al. (1996) beschriebenen Protokolle. Nach Inkubation in den verschiedenen Testmedien wurde Aliquots mit je  $3 \cdot 10^6$  Spermatozoen abgenommen, in ein Eppendorf-Cup überführt und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet in 1 ml pNaCl resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde das Pellet in 20 µl Probenpuffer nach Laemmli (1970, siehe Anhang) resuspendiert. Die Probe wurde dann 30-45 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und gelegentlich gevortext. Im Anschluß daran wurden Zellen im Ultraschallbad für 15 min lysiert. Der letzte Schritt der Proteinextraktion war die Denaturierung durch 5 min Inkubation bei 100 °C. Die Proteinextrakte wurde entweder sofort in der Gelelektrophorese aufgetrennt oder bei -20 °C gelagert.

##### Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Spermatozoenproteine erfolgte durch Gelelektrophorese. Im SDS-Page werden Proteine nach dem Massengewicht ihrer Monomere aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Proteinoligomere werden durch die Spaltung der Disulfidbrücken durch 2-β-Mercaptoethanol in ihre Monomere zerlegt. Die Eigenladung dieser Monomere wird durch SDS überdeckt und ermöglicht so die Auftrennung im elektrischen Feld. Die Laufgeschwindigkeit im Gel ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Massengewichtes der Proteine.

Die Anleitung für die Gelelektrophorese wurde in leicht veränderter Form aus der Diplomarbeit von Ely (1995) übernommen. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Minigelanlage (HOEFER). Nach dem Aufbau der Anlage gemäß der Anleitung wurde das Trenngel gemischt (siehe Tab.2) und sofort gegossen.

**Tab.2** Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel	10 %
Acrylamid-Stammlsg.	1.66 ml
8 x Trenngel-Puffer (siehe Anhang)	625 µl
H <sub>2</sub> O	2.64 ml
SDS (10%)	50 µl
AMPS (10%; 10mg/100µl)	25 µl
TEMED	2.5 µl

Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, mußte das Gel sofort nach dem Gießen mit  $\text{bH}_2\text{O}$  überschichtet werden. Dieses  $\text{bH}_2\text{O}$  konnte nach erfolgter Polymerisation (ca. 30 min) mit Filterpapier (Schleicher&Schüll) abgesaugt und die Glaswände gut getrocknet werden. Dann wurde das Sammelgel gemischt und dieses bis zum Glasplattenrand gegossen. Sofort danach erfolgte das luftblasenfreie Einsetzen des Gelkammes.

**Tab.3** Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel	3 %
Acrylamid-Stammlsg.	0.5 ml
4 x Sammelgel-Puffer (siehe Anhang)	1.25 ml
$\text{H}_2\text{O}$	3.16 ml
SDS (10%)	50 $\mu\text{l}$
AMPS (10%)	30 $\mu\text{l}$
TEMED	10 $\mu\text{l}$

Die Polymerisationszeit betrug auch hier ca. 30 min. Nach dem Entfernen des Gelkammes wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Kammerpuffer (siehe Anhang) gefüllt. Das Befüllen der Geltaschen mit den Proben erfolgte mit einer Hamiltonspritze. Die Laufzeit für die Auftrennung bei 180 V und 10 mA betrug ca. 90 min.

#### Coomassie Färbung

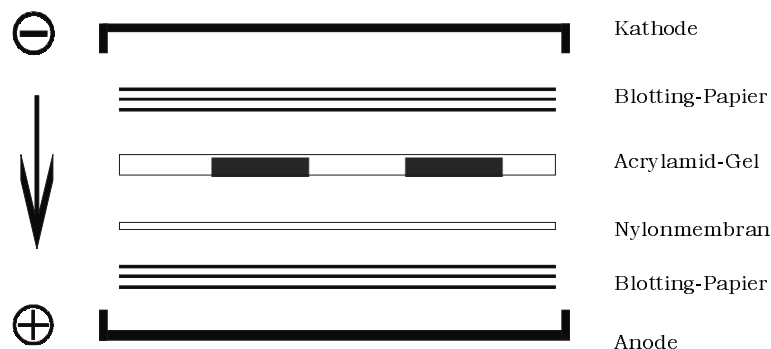
Die Coomassie-Färbung diente der Banden-Färbung in SDS-Gelen. Mittels dieser Färbung konnte zunächst der Erfolg von Proteinextraktion und Auftrennung im SDS-Gel überprüft werden. Außerdem wurde damit der Transfer der Proteine auf die Membran nach erfolgtem Western-Blot überprüft. Die Gele wurden in die Coomassie-Färbelösung (siehe Anhang) gelegt und über Nacht auf dem Schüttler geschüttelt. Im Anschluß an die Färbung wurde dreimal für jeweils mindestens 20 min in Entfärbelösung (siehe Anhang) erneut geschüttelt, um überschüssigen Farbstoff auszuwaschen. Danach erfolgte die Lagerung der Gele für 1-3 h in 10 % Eisessig bei 4°C. Zur Aufbewahrung mußten die Gele getrocknet werden. Dazu wurden sie zunächst auf Filterpapier (Schleicher&Schüll) aufgelegt und dann für mindestens 4 h bei 60°C im Gel-Trockner getrocknet. Nach dem Einschweißen waren die Gele so für mehrere Monate haltbar.

#### Western Blot

Die in der oben beschriebenen Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine waren im Gel nicht für eine Immunodetektion zugänglich. Sie mußten deshalb auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Dies geschah mittels einer *semi-dry-blotting*-Kammer (Fisher Scientific GmbH) im Western-Blot-Verfahren. Das Prinzip des Western Blots beruht darauf, daß Proteine aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld zur Anode wandern und an der Membran, die eine hohe Bindungsaffinität zu Proteinen hat, haften bleiben.

Sowohl die Filterpapiere (Schleicher&Schüll) als auch die Membran (Hybond C, Amersham) wurden in Transferpuffer (siehe Anhang) getränkt. Nach dem Aufbau des Blots gemäß der

Anleitung (siehe Abb. 12) wurde 90 min bei einer Spannung von  $U = 30 \text{ V}$  und einer Stromstärke  $1,5 \text{ mA pro cm}^2$  Membran geblottet.



**Abb. 12** Schematischer Aufbau des Western Blots

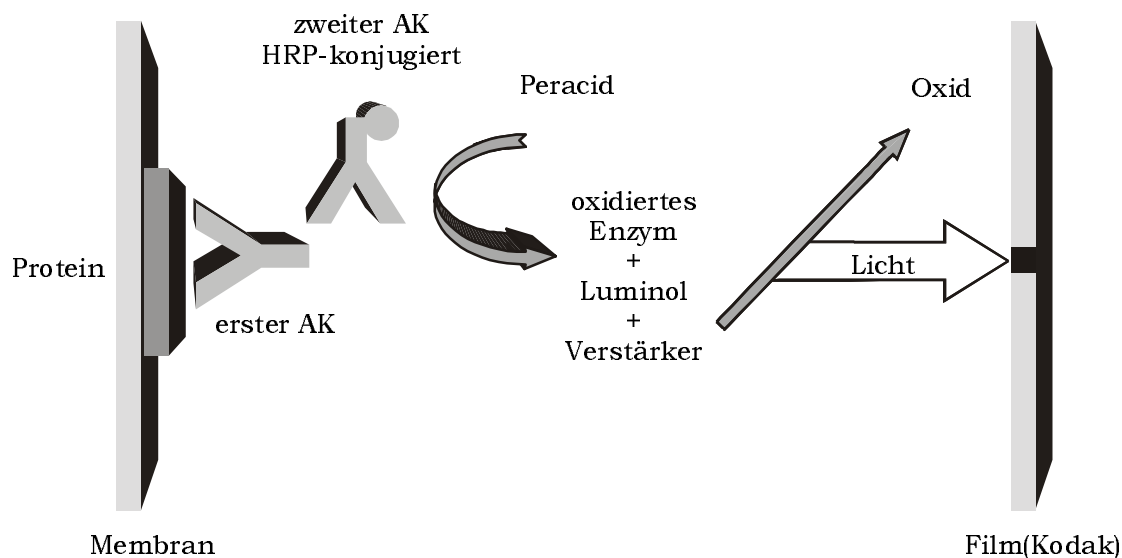
Der Erfolg des Transfers wurde mittels der Ponceau-Färbung überprüft. Dabei erfolgte die Markierung der einzelnen Proteinbanden auf der Membran durch den Farbstoff Ponceau S (Merck). Dazu wurde die Membran für 1 min in der Färbelösung (siehe Anhang) inkubiert und anschließend mit  $\text{bH}_2\text{O}$  der überschüssige Farbstoff abgewaschen.

#### Immunodetektion

Die Detektion der Tyrosin-phosphorylierten Proteine erfolgte nach einer Arbeit von Visconti et al. (1995). Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran mußten zunächst unspezifische Bindungsstellen blockiert werden. Dazu wurde die Membran für 2 h in *blocking solution 1* (siehe Anhang) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler („IKA-VIBRAX-VXR“, electronic) inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Membran zum Waschen für  $2 \times 5 \text{ min}$  in *blocking solution 2* geschüttelt. Während des Waschschrtes wurde der erste Antikörper (AK) „Anti-Phosphotyrosine, mouse monoclonal  $\text{IgG}_{2\text{bx}}$ “ (Upstate Biotechnology) 1:10000 in TTBS-Puffer verdünnt. Dazu wurden in ein Reaktionsgefäß (Sarstedt) 18 ml  $\text{bH}_2\text{O}$ , 2 ml TTBS-Stock (siehe Anhang) und 20  $\mu\text{l}$  Tween 20 vorgelegt. Darin wurden 2  $\mu\text{l}$  des AK verdünnt. Die Membran wurde 80 min bei RT in der AK-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Um überschüssigen AK zu entfernen, wurde die Membran im Anschluß für  $3 \times 10 \text{ min}$  in *wash solution* (siehe Anhang) gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper „Anti-mouse  $\text{IgG}$ , HRP-conjugated (goat polyclonal  $\text{IgG}$ )“ (Upstate Biotechnology). Dieser Antikörper ist mit dem Enzym Horseradish-Peroxidase konjugiert, das für die Detektion mittels der verbesserten Chemolumineszenz (*enhanced chemoluminescence*, ECL) eine wesentliche Grundlage bildet. Der AK 2 wurde 1:5 000 wie AK 1 in TTBS-Puffer verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  unter leichtem Schütteln. Am nächsten Tag wurde durch intensives Waschen der überschüssige Antikörper von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran für  $3 \times 2 \text{ min}$ ,  $1 \times 15 \text{ min}$  und schließlich  $2 \times 5 \text{ min}$  in jeweils mindestens 30 ml wash solution (siehe Anhang) auf dem Schüttler inkubiert. Zur Detektion der

durch AK 1 und AK 2 markierten Tyrosin-phosphorylierten Proteine wurde die Membran im Anschluß an die Waschschrte mit der das Substrat enthaltenden ECL-Lösung (Amersham) behandelt. Dazu wurden 1 ml ECL1, 1 ml ECL2 und 2 ml H<sub>2</sub>O gemischt und die Membran in diesem Gemisch 1 min inkubiert. Danach wurde die Membran sofort in Frischhaltefolie verpackt und dabei darauf geachtet, daß die Membran nicht austrocknet.

Das Prinzip der Detektion durch Chemolumineszenz ist in Abb. 13 dargestellt. Durch das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym Peroxidase wird das Substrat in der ECL-Lösung gespalten. Dabei werden Lichtsignale freigesetzt, mit denen ein Röntgenfilm belichtet werden kann.



**Abb. 13** Prinzip der Chemolumineszenz

Nach der Inkubation erfolgte in der Dunkelkammer die Exposition der Membran auf dem Röntgenfilm „X-OMAT AR“ (Kodak) für 1 min. Zur Filmentwicklung wurde der Film ca. 4 min in die Entwicklerlösung LX-24 (Kodak) getaucht. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Film im Anschluß für ca. 10 sec im Stoppbad (10 % Eisessig in H<sub>2</sub>O) geschwenkt und danach für 5 min im Fixierbad (POLYMAX) fixiert. Zum Abschluß der Entwicklung wurde der Film ca. 10 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Der Film wurde dann getrocknet und ausgewertet oder für spätere Auswertungen aufbewahrt.

### 2.5.2.3 auf Bindungsfähigkeit an die *Zona pellucida*

Die Kapazitierung umfaßt alle Änderungen und Reifungen des Spermatozoons nach der Ejakulation, die das Spermatozoon unter anderem dazu befähigen, mit der Eizelle zu fusionieren. Aus diesem Grund dient ein Test zur Bindungsfähigkeit *in vitro* kapazitierter Spermatozoen an die homologe *Zona pellucida* der Charakterisierung einer funktionellen



Kapazitierung. Die Bindung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen an die *Zona pellucida* wurde nach folgendem Protokoll untersucht:

#### Gewinnung der Eizellen

Die Eizellen aus antralen Follikeln wurden von Weibchen gewonnen, die im Rahmen anderer Experimente ovariectomiert werden mußten. Die Follikeldissektion erfolgte in steriler pNaCl-Lösung unter der Sterilbank. Die Follikel wurde mit 2 Insulinspritzen (OMNICA), deren Kanülen als Schneidwerkzeug benutzt wurden, eröffnet. Die von Kumuluszellen umgebenen, im Medium frei schwimmenden Eizellen wurden mit einer Mundpipette (in Brennerflammen ausgezogene Pasteurpipetten, Schlauchverbindung, Sterilfilter und Pipettenspitze als Mundstück) aufgesammelt. Der Innendurchmesser der Pasteurpipette war dabei etwas kleiner als der Durchmesser des Eizell-Kumulus-Komplexes. Dadurch konnten durch mehrmaliges Aufsaugen der Eizelle in die Pipette die Kumuluszellschichten entfernt werden (Lee & Storey, 1985; Liu et al., 1991). Da die Bindungstests nicht am Tag der Eizellgewinnung durchgeführt werden konnten, mußten die Eizellen gelagert werden. Arbeiten von Fayrer-Hosken & Brackett (1987) sowie Boatman et al. (1988) zeigen, daß auch nach der Lagerung in verschiedenen Salzlösungen die Bindungsaktivität der *Zona pellucida* in vollem Umfang erhalten bleibt. In der vorliegenden Arbeit wurden die vollständig von Kumuluszellen befreiten Eizellen in einer Salzlösung mit Hapes (Henkel et al., 1998; siehe Anhang) für max. 3 Monate bei 4 °C gelagert. Zur Vorbereitung des Bindungstest mußten die in Salzlösung gelagerten Eizellen wieder entsalzt werden. Dazu wurden sie einen Tag vor dem Test 2 Mal je 30 min in pNaCl bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluß an diese Waschschrte wurden die Eizellen in frische pNaCl umgesetzt und so über Nacht bei 4 °C gelagert.

#### Präparation der Spermatozoen

Die Spermatozoengewinnung erfolgte durch PVS oder *vaginal washing* mit pNaCl. Die Proben wurden wie oben beschrieben (siehe 2.3.2) durch eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Das die Spermatozoen enthaltende Pellet wurde in 200 µl TALP ohne Kalzium resuspendiert und die Probe gesplittet. Da der Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf die Bindungsfähigkeit der Spermatozoen getestet werden sollte, wurde ein Aliquot in TALP mit 2 mM Kalzium, der andere Teil in TALP ohne zusätzliches Kalzium (TALPoC) verdünnt. Nach Zentrifugation (5 min bei 1500 rpm) und Abnahme des Überstandes wurden die Pellets in 100 µl TALPmC bzw. 100 µl TALPoC resuspendiert. Nach Beurteilung der Spermatozoen im Eosinpräparat (lebend:tot) und Bestimmung der Zellzahl wurde durch Verdünnung im jeweiligen TALP-Medium eine Dichte von ca.  $20 \cdot 10^6$  Spermatozoen/ml eingestellt. Bis zum Einsatz in den Bindungstest wurde die Proben zur Kapazitierung bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert.

#### Bindungstest

Der Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf Kapazitierung und Bindung an die *Zona pellucida* wurde mittels Modifikationen der Protokolle von Liu et al. (1991) und Yanagimachi

et al. (1979) getestet. Zunächst wurden in eine Petrischale (Greiner) 50 µl TALPmC bzw. TALPoC in einem Tropfen (Ø ca. 7-8 mm) vorgelegt. Dieser Tropfen wurde dann mit 3-4 ml Silikonöl beschichtet. Diese Beschichtung diente der Stabilisierung des pH-Wertes. In den vorgelegten Tropfen wurde mittels der Mundpipette 9-10 der entsalzten Eizellen gesetzt. Nach der Inkubationszeit von 2 h zur Kapazitierug der Spermatozoen wurde zu den Tropfen TALPmC und TALPoC das jeweils gleiche Volumen Spermatozoen in TALP mit/ohne Ca<sup>2+</sup> gegeben, so daß die Spermatozoendichte schließlich ca. 10\*10<sup>6</sup> Spermatozoen/ml betrug. Die Endkonzentration des extrazellulären Kalziums betrug in Abhängigkeit vom vorgelegten Tropfen und der Spermatozoensuspension 0, 1 respektive 2 mM. Die Schalen wurden dann für 2-4 h bei 37 °C auf einer Heizplatte inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Oocyten mittels der Mundpipette 2 Mal in pNaCl gewaschen, um nur lose gebundene Spermatozoen zu entfernen. Diese Waschschrirte wurde in einer 4-well-Platte (Nunc) durchgeführt. Für die Auswertung der Anzahl fest gebundener Spermatozoen unter dem Mikroskop mußten die Eizell-Spermatozoen-Komplexe auf Objektträger übertragen werden. Dafür wurde auf einem Hohlschliffobjektträger ein Tropfen pNaCl (ca. 20 µl) vorgelegt. In diesen Tropfen wurde die Oocyten aus der Inkubationsschale gesetzt und mit einem Deckglas vorsichtig bedeckt. Das Deckglas wurde mit dem Eindeckmittel NEOMOUNT versiegelt, um die Austrocknung der Tropfen zu verhindern. Die Auszählung der an die einzelnen Oocyten gebundenen Spermatozoen erfolgte im Dunkelfeld bei 200facher Vergrößerung am AXIPHOT (ZEISS). Dabei wurden von 0-49 gebundenen Spermatozoen alle ausgezählt, darüber hinaus wurden die Eizellen in die Kategorien > 50 oder >100 gebundene Spermatozoen eingeteilt. Zur Auswertung dieser Tests, wurde die Zahl gebundener Spermatozoen in TALPoC als Kontrollgruppen benutzt. Die Oocyten in TALPmC, TALPoC + 1 mM Ca<sup>2+</sup> und TALPoC + 2 mM Ca<sup>2+</sup> waren die Testgruppen. Bestimmt wurde der absolute Wert der Zahl gebundener Spermatozoen sowie die Differenz zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe, da zwischen den einzelnen Testtagen große Schwankungen bestanden.

### 2.5.3 Physiologische Induktion der Akrosomreaktion

Nachdem der Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf die Proteinphosphorylierung, auf die Bindung an die *Zona pellucida* und auf die Induktion der Akrosomreaktion durch den künstlichen Induktor Kalziumionophor A23187 untersucht worden war, stellt sich die Frage, ob die Effekte von Kalzium auch mit einem physiologischen Induktor der Akrosomreaktion nachweisbar sind. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Wirkung des Steroids Progesteron untersucht.

#### 2.5.3.1 Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron

Die erste Versuchsreihe wurde mit durch *vaginal washing* gewonnenen Spermatozoen durchgeführt. Nach Aufreinigung und Kapazitierug (2 h) in TALP ohne extrazelluläres Kalzium wurde die Akrosomreaktion mit Progesteron induziert. Dafür wurde eine Konzentration von 12,5 µM des Steroides gewählt, da in verschiedenen Studien an humanen Spermatozoen, die als Vorlage dienten, Konzentrationen zwischen 0,3 und 30 µM verwendet wurden. Zur Induktion wurden 40 µl Spermatozoensuspension in ein vorgewärmtes Eppendorf-

Cup pipettiert, in das 5 µl Kalziumstock (20 mM) und 5 µl des Steroidstocks (125 µM) vorgelegt worden waren. Nach einer Inkubation für 10 min bei 37 °C wurde die Probe für 10 min mit dem Vitalfarbstoff Höchst 33258 inkubiert, um tote Spermatozoen zu markieren. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne den Zusatz von Progesteron mitgeführt. Das weitere Vorgehen zur Markierung der akrosom-reagierten Spermatozoen erfolgte nach dem unter 2.4.2 beschriebenen Protokoll.

#### 2.5.3.2 Dosis-Wirkung-Beziehung

Studien an Spermatozoen einiger weniger Spezies, z.B. human (Tesarik et al., 1993), Pferd (Cheng et al., 1998) lassen vermuten, daß die Reaktion auf das Steroid ein rezeptorvermittelter Prozeß ist. Um zu überprüfen, ob dies auch für Spermatozoen des Weißbüschelaffen zutrifft, wurde im Folgenden eine Dosis-Wirkung-Untersuchung durchgeführt. Eine Reaktion auf geringe Konzentrationen Progesteron ist nur dann möglich, wenn die Umsetzung des Steroidsignals in die Zelle durch einen Rezeptor erfolgt.

Die Spermatozoen wurde nach der Gewinnung durch Vaginalspülung und der Präparation mittels *swim up* in TALP ohne Zugabe von extrazellulärem Kalzium für 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß an die Kapazitierung *in vitro* erfolgte die Induktion der AR mit dem Kalziumionophor A23187 (Endkonzentration 5 µM) sowie mit Progesteron 1 µM und 10 µM. Benutzt wurde ein Stock des Steroids (5 mM) in Dimethylsulfoxid (DMSO). Zur Kontrolle wurde ein Aliquot Spermatozoen mit dem Lösungsmittel für Progesteron DMSO inkubiert. Die Inkubation mit den Induktoren erfolgte 10 min bei 37 °C im Wärmeblock. Direkt im Anschluß an die Induktion der AR wurde die Proben mit dem Supravitalfarbstoff Höchst33258 nach dem unter 2.4.1.3 beschriebenen Protokoll behandelt. Detektiert wurden der Anteil lebender akrosom-reagierter Spermatozoen durch die kombinierte Fluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.4.2).

#### 2.5.3.3 Rezeptornachweis

Steroidrezeptoren sind im klassischen Sinne genomische, also kernständige Rezeptoren. Untersuchungen an humanen Spermatozoen (Mendoza & Tesarik, 1993; Castilla et al., 1995; Sabeur et al., 1996) zeigten, daß es sich bei der Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron allerdings nicht um einen durch den genomischen Rezeptor vermittelten Prozeß handelt, sondern das die Wirkung des Steroids vermutlich durch einen membranständigen Rezeptor in die Zelle geleitet wird. Dieser membranständige Rezeptor konnte mittels einer Antikörpermarkierung bei Hengstspermatozoen bereits nachgewiesen werden (Cheng et al., 1998).

Ziel dieses Untersuchungsabschnittes war einerseits die Markierung des membranständigen Rezeptors bei Spermatozoen des Weißbüschelaffen und zusätzlich die Überprüfung, ob dieser nicht-genomische Rezeptor nach einer Kapazitierung ohne extrazelluläres Kalzium nachweisbar ist.

Die Markierung erfolgte nach dem modifizierten Protokoll nach Cheng et al. (1998). Die durch VW gewonnenen Spermatozoen wurden aufgereinigt (siehe 2.3.2) und 2 h in TALPoCa bei 37

°C inkubiert. Nach dieser Kapazitierungszeit wurden 100 µl Spermatozoensuspension mit 100 µl 2% Paraformaldehydlösung (in PBS) in einem Eppendorf-Cup gemischt und 10 min inkubiert. Die Probe wurden dann für 3 min bei 600 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zum Waschen in 0,5 ml pNaCl resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 3 min bei 600 x g wurde der Überstand wieder abgenommen. Das Pellet wurde in 10 µl Antikörpersuspension resuspendiert. Die Antikörpersuspension wurde erstellt, in dem das Lyophilisat des Antikörpers „anti Progesteronrezeptor, monoclonale mouse IgG1“ (DIANOVA, 50 µg) zuvor in 200 µl bH<sub>2</sub>O aufgenommen wurde und die Aliquots bei -20 °C lagerten. Die Spermatozoen wurden mit 0,25 mg/ml des Antikörpers 1h bei 37°C inkubiert. Zum Auswaschen des überschüssigen Antikörpers wurde die Probe nach der Inkubation mit 500 µl pNaCl mit 3 mg/ml BSA aufgefüllt und 3 min bei 600 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 50 µl pNaCl resuspendiert und dazu wurden 4 µl Stammlösung des 2. Antikörpers gegeben. Dabei handelt es sich um den FITC-markierten Ziege-anti-Maus Antikörper (Immunotech), der in einer Konzentration von 0,75 mg/ml in bH<sub>2</sub>O resuspendiert wurde. Die Spermatozoen wurden 1h bei 37°C mit AK2 (Endkonzentration: 0,06 mg/ml) im Wärmeblock inkubiert. Für den anschließenden Waschschrift wurden zur Probe 500 µl pNaCl zugegeben und 3 min bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 10 µl abgenommen. Diese die markierten Spermatozoen enthaltende Suspension wurde auf einem in Ethanol gereinigten Objektträger ausgezogen und nach dem Trocknen mit dem Eindeckmittel Citifluor® AF2 (Plano, Cappel) und einem Deckgläschen versiegelt. Die markierten Spermatozoen wurden mit dem AXIOPHOT Mikroskop (ZEISS) bei einer 630fachen Vergrößerung beurteilt. Spermatozoen mit einem FITC-gelabelten Progesteronrezeptor wurden mit dem UV-Filter No.09 (Anregungsfilter: 450-490 nm, Sperrfilter: 520 nm) visualisiert und für die Dokumentation fotografiert.

#### 2.5.4 Einfluß von intrazellulärem Kalzium (Bindung des intrazellulären Kalziums)

Die Akkumulation von Kalzium ist für verschiedene Spezies als Ereignis der Kapazitierung beschrieben (u.a. Baldi et al., 1991; Cordoba et al. 1997; Suarez&Dai, 1995) und könnte einen Regulationsmechanismus für zahlreiche Prozesse darstellen. Aus diesem Grund sollte in abschließenden Experimenten diese intrazelluläre Kalziumkonzentration näher untersucht werden.

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Kalziumkonzentration in einer lebenden Zelle bietet der membrangängige Kalziumchelator 1,2-bis(o-Aminophenoxy)-Ethan-N,N,N,N-Tetra-(Acetoymethyl)-ester (BAPTA/AM; Calbiochem). BAPTA/AM bindet das freie im Zytoplasma der Zelle flottierende Kalzium.

Dieser Chelator wurde 10 mM in DMSO gelöst und die Aliquots bei -20°C gelagert. Um den Einfluß von intrazellulärem Kalzium auf die Kapazitierung *in vitro* zu bestimmen, wurden die Spermatozoen nach Gewinnung und Aufreinigung in TALPoCa resuspendiert und gesplittet. Ein Aliquot wurde wie zuvor beschrieben in einem mit Parafilm verschlossenen Glasröhrchen inkubiert. Dem zweiten Aliquot der Spermatozoenprobe wurde der Chelator BAPTA/AM in

einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Zur Kapazitierung wurden beide Ansätze für 2 h bei 37 °C in einem Wärmeblock inkubiert. Im Anschluß an diese Inkubation wurde die Akrosomreaktion als Marker für eine erfolgreiche Kapazitierung *in vitro* mit dem Ionophor A23187 induziert wie zuvor beschrieben. Mittels der kombinierten Fluoreszenzfärbung FITC-PSA und Höchst 33258 (siehe 2.4.2) wurden die lebenden akrosom-reagierten Spermatozoen per Fluoreszenzmikroskopie detektiert.

## 2.6 Statistik

Die Analyse der Daten wurde ausschließlich in SIGMA STAT, Version 2.0 (Jandel Scientific) durchgeführt.

Die Verteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft, der bei  $p > 0,05$  die Normalverteilung der Daten annimmt. Hauptsächlich wurden Mittelwerte verglichen, um Unterschiede zwischen den Testgruppen zu charakterisieren. Dies geschah in Abhängigkeit von der Verteilung der Daten mit den t-Test (normalverteilt) oder mit dem Rank Sum Test (nicht normalverteilt). Signifikante Unterschiede waren durch  $p < 0,05$  gekennzeichnet.

Der Korrelationskoeffizient  $r$ , der den Zusammenhang zwischen 2 Variablen beschreibt, wurde ebenfalls in Abhängigkeit von der Verteilung der Daten nach Pearson (normal verteilt) oder nach Spearman (nicht normal verteilt) berechnet. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  galten auch dabei als signifikant.

### 3. Ergebnisse

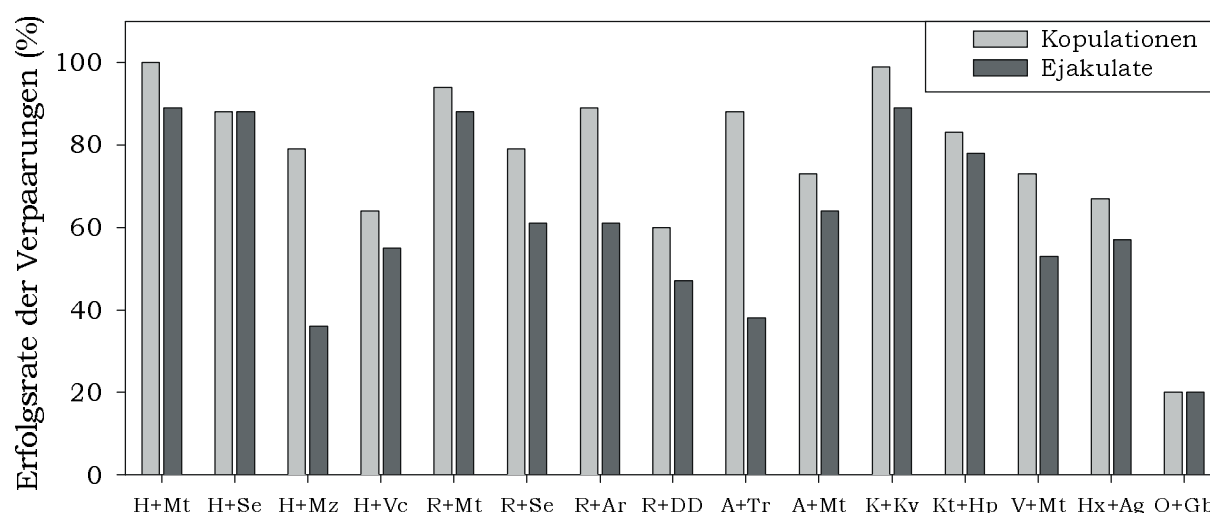
Die Präsentation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erfolgt in 3 großen Abschnitten. Der erste Abschnitt zeigt die Daten zur Spermatozoensammlung und zu beeinflussenden Faktoren sowie zur Etablierung von Präparations- und Markierungstechniken. Im zweiten Abschnitt sind die Daten zur Charakterisierung der Kapazitierung *in vitro* zusammengefaßt. Der dritte Abschnitt fokussiert den Einfluß von Kalzium auf die Weißbüschelaffen-Spermatozoen *in vitro*.

#### Spermatozoensammlung, Präparation & Etablierung grundlegender Methoden

##### 3.1 Spermatozoensammlung

Zur Sammlung von Spermatozoen bei *Callithrix jacchus* wurden 4 verschiedene Methoden etabliert: (a) Präparation aus dem Nebenhoden (Lopata et al., 1988); (b) Elektroejakulation (Cui et al., 1991); (c) Vaginalspülung nach Kopulation (Küderling et al., 1996) und (d) penile Vibrostimulation (Küderling et al., in prep.). Der Vorteil der beiden letztgenannten Methoden liegt in geringer Invasivität sowie unbegrenzter Wiederholbarkeit. Daher wurde in erster Linie die Methode der Vaginalspülung zur Sammlung von Spermatozoen für die vorliegende Arbeit gewählt.

Der Erfolg dieser Methoden wurde entscheidend von der Kompatibilität der Paare beeinflusst. Aber auch subjektive Faktoren (z. B. Stress, Ablenkung, Motivation) beeinflussten das Ergebnis. Abb. 14 zeigt die Variabilität der Erfolgsrate der Verpaarungen zwischen den verschiedenen Paaren. Die Anzahl der Verpaarungsereignisse wurde gleich 100% gesetzt und der Anteil beobachteter Kopulationen (hellgrau) sowie der Anteil der in der Spüllösung gefundenen Ejakulate (dunkelgrau) berechnet.



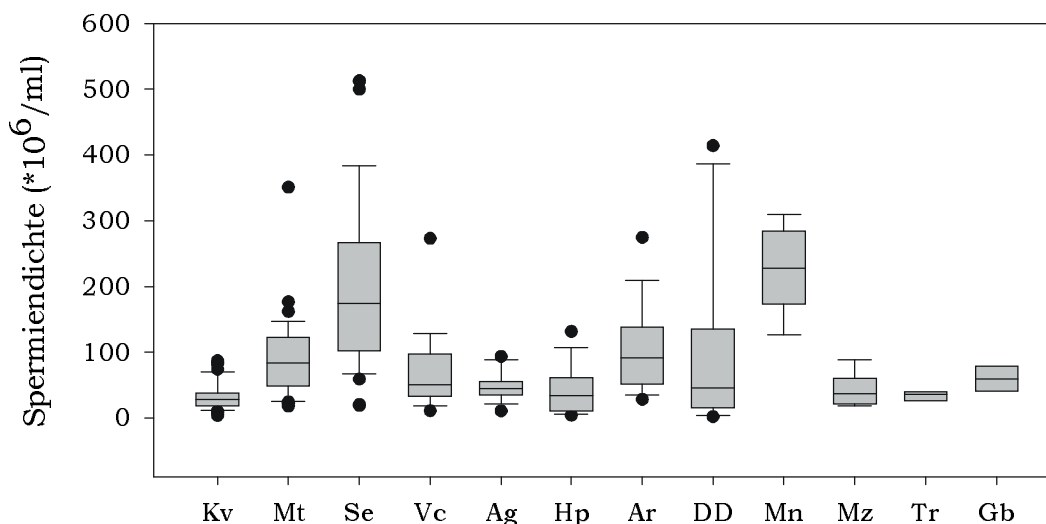
**Abb. 14** Erfolgsrate der Verpaarungen für alle Paarungskombinationen

Dargestellt ist der Anteil Kopulationen (hellgrau) und Ejakulate (dunkelgrau) bezogen auf die Anzahl der Verpaarungsereignisse (%) für alle Paarungskombinationen.

Legende für die Abkürzungen der Tiernamen (♀ + ♂) siehe Anhang.

Der Anteil tatsächlich erfolgreicher Kopulationen lag zwischen 20 und 100% ( $77,1 \pm 5,2\%$ ), der der gefundenen Ejakulate zwischen 20 und 89% ( $61,6 \pm 5,5\%$ ). Beim Vergleich der Erfolgsraten eines Weibchens mit verschiedenen Männchen wird deutlich, daß die Kompatibilität der Paarungspartner einen entscheidenden Einfluß auf den Erfolg der Verpaarungen hat. Betrachtet man z. B. Weibchen H, so erfolgte mit Männchen Mt in 100% der Verpaarungen eine Kopulation und in 89% konnte ein Ejakulat gewonnen werden. Dagegen gestattet das gleiche Weibchen H mit Männchen Mz nur in 79% der Versuche eine Kopulation und nur in 36% der Ereignisse konnte tatsächlich ein Ejakulat gefunden werden. Wurde in der Spüllösung kein Ejakulat gefunden, galt dies als nicht erfolgte Ejakulation. Daß ein inseminiertes Ejakulat nicht gespült werden konnte, ist aufgrund der Routine in dieser Methode nahezu auszuschließen.

Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Sammlungsmethode von Spermatozoen ist die gewonnene Spermatozoendichte. Der Graph in Abb. 15 zeigt die Daten für die Sammlung durch Vaginalspülung von 12 Männchen. Da die Daten der einzelnen Tiere nicht normalverteilt waren, wurde für die Darstellung der Median und die Perzentile (10%, 25%, 75% und 90%) gewählt, um so die Streuung der Spermatozoendichten besser demonstrieren zu können.



**Abb. 15** Spermatozoendichte ( $\cdot 10^6$  Spermatozoen/ml) im Ejakulat je Tier ( $n = 12$ )

Dargestellt sind die Mediane, die Boxen markieren den Bereich zwischen 25 und 75% der Einzelwerte. In dem durch die *error bars* gekennzeichneten Bereich liegen 10–90% der Einzelwerte. Die schwarzen Kreise markieren Einzelwerte, die nicht in diesen Bereichen fallen, die außerhalb der 10% und 90% Bereiche der Daten liegen.

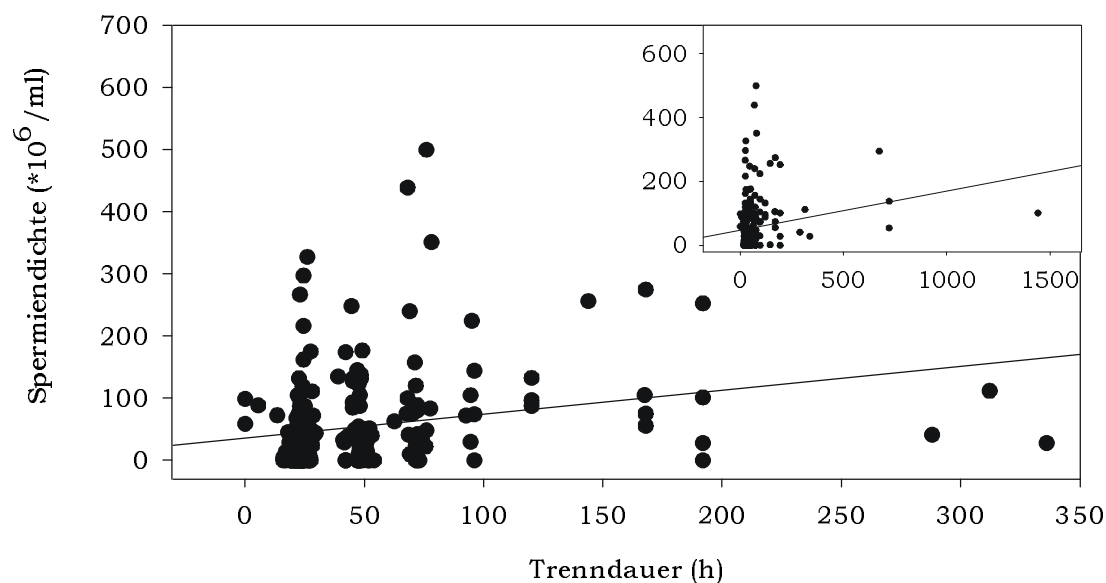
Die mittlere Spermatozoendichte betrug  $88,9 \pm 18,4 \cdot 10^6$  Spermatozoen/ml. Die Spermatozoendichte variierte sowohl inter- als auch teilweise intraindividuell sehr stark. Die Mittelwerte aller Tiere umfassen einen Bereich von  $32,4 \pm 3,2 \cdot 10^6$  Spermatozoen/ml (Männchen Kv) bis  $225,5 \pm 32,2 \cdot 10^6$  Spermatozoen/ml (Männchen Mn). Ursachen für diese starken Variationen zwischen den Tieren sind zunächst nicht erkennbar, z. B. zum Alter der

Männchen besteht keine Korrelation. Die intraindividuellen Variationen werden besonders deutlich bei der Betrachtung des Männchens Se. Die minimale Spermatozoendichte dieses Tieres betrug  $19,9 \cdot 10^6$  Spermatozoen/ml, die maximale  $512 \cdot 10^6$  Spermatozoen/ml.

Diese intraindividuellen Variationen in der Spermatozoendichte können durch verschiedene Faktoren bedingt sein. So sind z. B. jahreszeitliche Schwankungen vorstellbar. Die Betrachtung der Spermatozoendichte eines Tieres im Jahresverlauf läßt jedoch keine Periodizität erkennen (ohne Abbildung).

Im Folgenden soll der Einfluß von zwei Faktoren, die möglicherweise die Spermatozoendichte beeinflussen, näher charakterisiert werden: die Dauer der Trennung der Paarungspartner sowie die Kompatibilität der Paarungspartner. Als abhängige Variable wurde die Spermatozoendichte in der Spüllösung betrachtet.

Zunächst wurde die Dauer der Trennung der Paarungspartner untersucht. Wie im Kapitel „Material & Methoden“ beschrieben, wurden die Männchen vor der Sammlung von Spermatozoen vom Weibchen getrennt, um so einerseits die Motivation zu erhöhen, andererseits unbeobachtet Kopulationen unmittelbar vor der Sammlung zu verhindern. Abb. 16 zeigt, daß eine schwache, aber hochsignifikante Korrelation zwischen Spermatozoendichte und Trennungsdauer besteht.



**Abb. 16** Beziehung zwischen Trennungsdauer und Spermatozoendichte

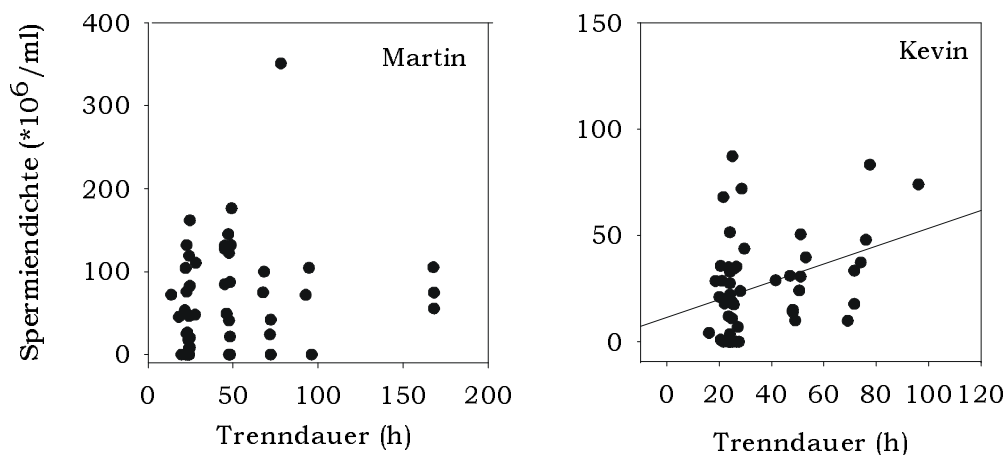
Dargestellt ist die Spermatozoendichte jeder einzelnen Probe ( $\cdot 10^6$  Spermatozoen/ml) gegen die entsprechende Trennungsdauer (h). **Kleiner Graph:** alle Proben mit Trenndauern von 0 bis 1440 h ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,005$ ). **Großer Graph:** nur Proben mit einer Trenndauer zwischen 0 und 340 h ( $r = 0,33$ ;  $p < 0,005$ ).

Der kleine Graph zeigt alle erfaßten Daten mit einer Trennungsdauer bis zu 60 Tage, die sich u.a. aus Umverpaarungen der Versuchstiere ergab ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,005$ ). Der große Graph zeigt die experimentellen Werte und umfaßt Trennungszeiten von 0 bis 340 h ( $r = 0,3$ ;  $p < 0,005$ ). Die



signifikanten Korrelationen in beiden Graphen belegen, daß die Dauer der Trennung eine Größe ist, die die Spermatozoendichte im Ejakulat beeinflusst.

Ein Grund für die interindividuellen Variationen in der Spermatozoendichte könnte sein, daß die einzelnen Tiere unterschiedlich auf die Trennungsdauer reagieren. Abb. 17 zeigt exemplarisch für 2 Tiere die Beziehung zwischen Trennungsdauer und Spermatozoendichte, rechts mit einer signifikanten positiven Korrelation ( $r = 0,31$ ;  $p < 0,05$ ), links ohne signifikanten Zusammenhang ( $r = 0,2$ ,  $p > 0,05$ ).



**Abb. 17** Beziehung zwischen der Trennungsdauer und der Spermatozoendichte

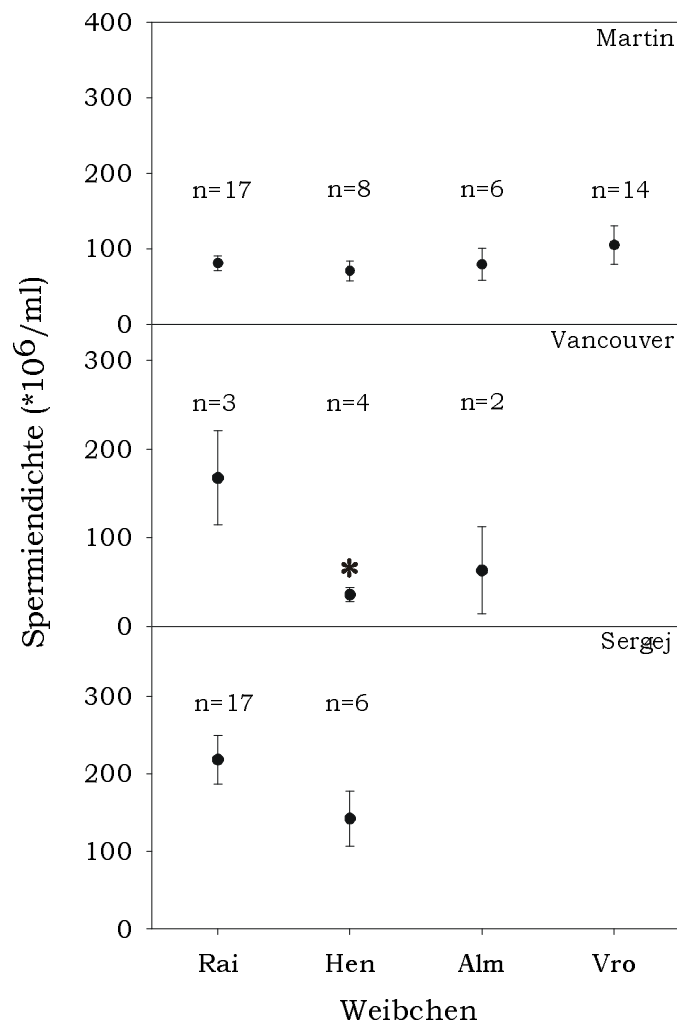
Dargestellt ist jeweils die Spermatozoendichte jeder Probe ( $\cdot 10^6$  Spermatozoen/ml) gegen die entsprechende Trennungsdauer (h).

**links:** Martin (Mt);  $n=48$ ,  $r=0,2$ ,  $p>0,2$ ; **rechts:** Kevin (Kv);  $n=51$ ,  $r=0,31$ ,  $p<0,05$ .

Die Kompatibilität zwischen Männchen und Weibchen ist ein zweiter möglicher Faktor, der in Bezug auf die Spermatozoendichte und die interindividuelle Varianz dieser Größe untersucht werden sollte.

In Abb. 18 sind für 3 Männchen die mittlere Spermatozoendichte im Ejakulat in Abhängigkeit vom Weibchen dargestellt. Jeder Graph zeigt die Spermatozoendichten (Mittelwert  $\pm$  SEM) eines Männchens, die nach der Kopulation mit 2, 3 oder 4 verschiedenen Weibchen in der Spüllösung gefunden wurden.

Der Graph für Männchen Mt (Martin) läßt keine signifikante Unterschiede in der Spermatozoendichte in Abhängigkeit vom Weibchen erkennen. Das heißt, für dieses Männchen beeinflusst die Kompatibilität der Paarungspartner die Spermatozoendichte nicht. Im Gegensatz zur Erfolgsrate der Verpaarungen, die bei diesem Männchen deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Paarungsweibchen zeigte (siehe Abb. 14). Gleiches gilt für Männchen Se (Sergej), daß keinen signifikanten Unterschied in der Spermatozoendichte zeigte. Einzig für Männchen Vc (Vancouver) bestand ein signifikanter Unterschied in der Spermatozoendichte in Abhängigkeit vom Weibchen. Allerdings ist der Trend, daß nach Kopulation mit Weibchen R eine höhere Spermatozoendichte erreicht wird als bei Weibchen H, in allen drei Graphen zu erkennen.



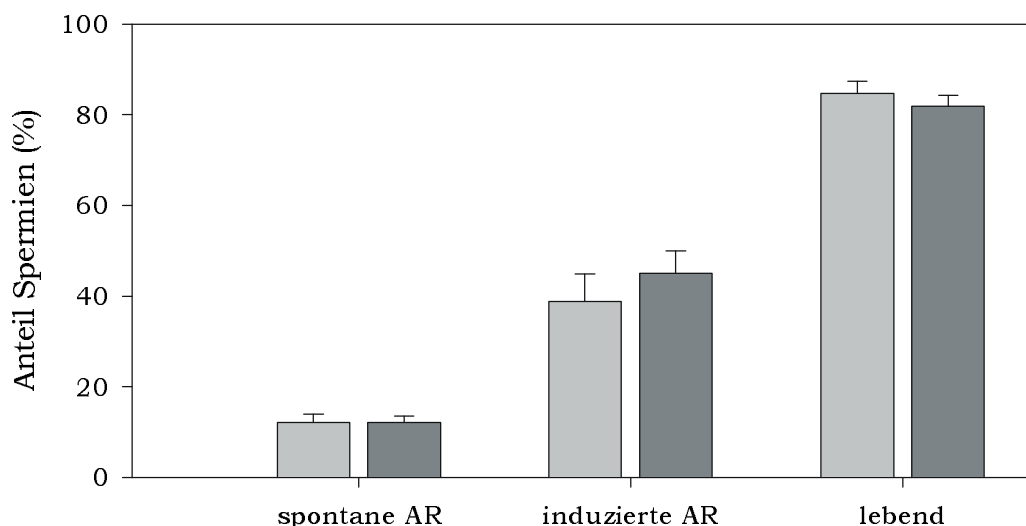
**Abb. 18** Beziehung zwischen Paarungsweibchen und Spermatozoendichte

Aufgetragen sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der Spermatozoendichten gegen die einzelnen Weibchen. Signifikanter Unterschied durch \* gekennzeichnet.

### 3.2 Vergleich verschiedener Aufreinigungstechniken

In der andrologischen Spermatozoenforschung werden verschiedene Methoden verwendet, um Spermatozoen zu reinigen und zu konzentrieren. Da in der vorliegenden Arbeit zwei dieser Methoden verwendet werden sollten (*swim up* und Dichtegradienten-Zentrifugation mit Percoll), mußte zunächst untersucht werden, ob diese Methoden die Qualität der Spermatozoen unterschiedlich beeinflussen. Aus diesem Grund wurden in Abb. 19 der Anteil lebender spontan akrosom-reagierter Spermatozoen, induziert akrosom-reagierter Spermatozoen und lebende Spermatozoen gesamt für diese 2 Methoden mit Spermatozoen nach VW verglichen.

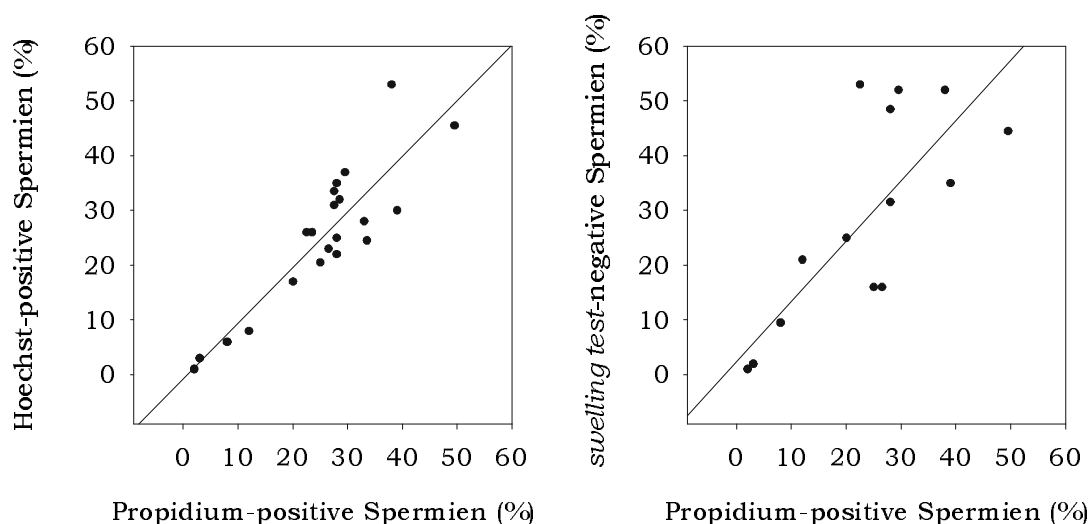
Die Darstellung läßt deutlich erkennen, daß sich weder der Anteil spontan akrosom-reagierter Spermatozoen (12,2% vs. 12,1%), noch der Anteil induziert akrosom-reagierter Spermatozoen (38,8% vs. 45,1%) oder der Anteil lebender Spermatozoen gesamt (84,8% vs. 81,8%) in Abhängigkeit von der Reinigungsmethode unterscheiden. Ein vergleichbares Bild ergibt sich für Spermatozoen, die durch PVS gewonnen wurden (ohne Abbildung).



**Abb. 19** Vergleich von *swim up* (hell) und Percoll (dunkel) für Spermatozoen nach VW  
Aufgetragen ist der Mittelwert (+ SEM) des Anteils Spermatozoen mit spontaner AR, durch A23187 induzierter AR und gesamtlebend paarweise für *swim up* und Percoll;  $n = 6$ ; Unterschiede zwischen den Reinigungsmethoden n.s.

### 3.3 Detektion toter Spermatozoen

In Vorbereitung der Markierungsprotokolle wurden drei verschiedene Methoden zur Detektion toter Spermatozoen verglichen: Fluoreszenzmarkierung mit Hoechst 33258 bzw. Propidiumjodid und *swelling test*. Die Abb. 20 soll zeigen, daß sich mittels dieser drei Methoden gleiche Anteile toter Spermatozoen detektieren lassen.



**Abb. 20** Vergleich der Methoden zur Detektion toter Spermatozoen

**links:** Anteil toter Spermatozoen in einer Probe nach Behandlung mit Hoechst 33258 vs. Propidiumjodid ( $r = 0,92$ ,  $p < 0,005$ ,  $n = 24$ ).

**rechts:** Anteil toter Spermatozoen in einer Probe nach Behandlung mit *swelling test* vs. Propidiumjodid ( $r = 0,82$ ,  $p < 0,005$ ,  $n = 17$ ).

Die hochsignifikante positive Korrelation zwischen dem Anteil toter Spermatozoen detektiert durch Hoechst 33258 und Propidiumjodid (linker Graph;  $r = 0,92$ ,  $p < 0,005$ ) bzw. durch *swelling test* und Propidiumjodid (rechter Graph;  $r = 0,82$ ,  $p < 0,005$ ) zeigt deutlich, daß die unterschiedlichen Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern, also gleichermaßen einsetzbar sind.

Da die Detektion toter Spermatozoen in Verbindung mit der FITC-Markierung des Akrosoms erfolgte (siehe Kapitel „Material & Methoden“, Abschnitt 2.4.2), wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 für alle weiteren Markierungen benutzt.

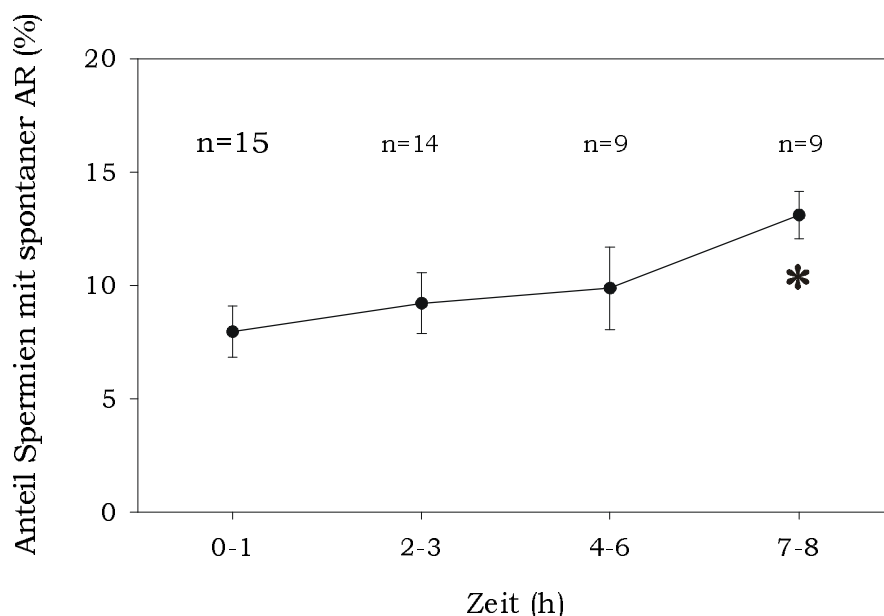
## Untersuchungen zu Kapazitierung und Akrosomreaktion *in vitro*

### 3.4 Untersuchungen zu Faktoren, die die Kapazitierung beeinflussen

Im ersten Abschnitt der Untersuchungen zur Physiologie sollte die Kapazitierung *in vitro* charakterisiert werden. Dazu mußte erstens das Vorkommen von spontaner und induzierter Akrosomreaktion als Endpunkt der Kapazitierung *in vitro* bewiesen und zweitens der Einfluß verschiedener aus der Literatur bekannter Kapazitierungsförderer überprüft werden. Die untersuchten Kapazitierungsförderer waren Heparin, cAMP & Coffein, weibliche Sekrete.

#### 3.4.1 Zeitverlauf

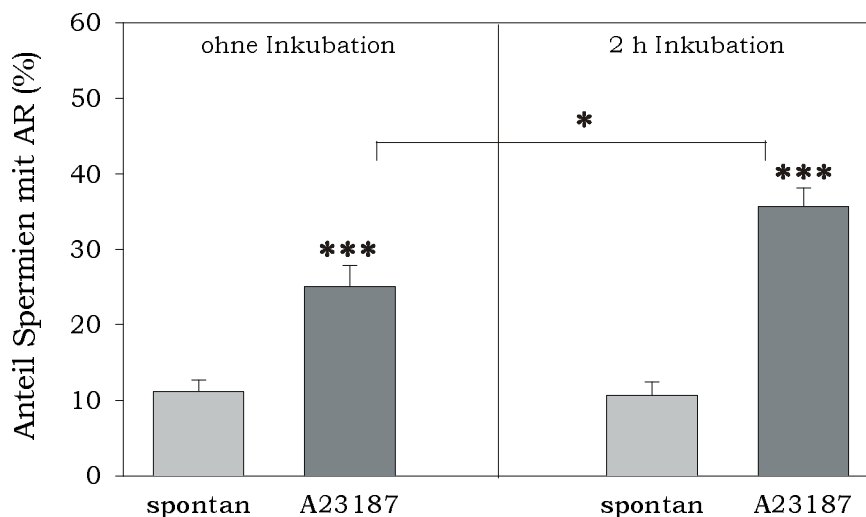
Im Verlauf der Inkubation der Spermatozoen von *Callithrix jacchus* in TALP mit Kalzium war über die Zeit eine signifikante Zunahme des Anteils der Spermatozoen mit spontaner Akrosomreaktion erst nach 7-8 h zu beobachten (s. Abb. 21).



**Abb. 21** Zunahme der Spermatozoen mit spontaner AR nach Inkubation in TALPmC

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der durch Kombination von PSA-FITC und H33258 detektierten lebenden akrosom-reagierten Spermatozoen ( $n = 15$ ). Signifikante Zunahme ist durch \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

Um zu klären, ob diese Zunahme nur ein Effekt der Akkumulation der Anzahl spontan akrosom-reagierter Spermatozoen ist oder ob die Kapazitierug der Spermatozoen zu dieser Zunahme geföhrt hat, wurde im folgenden Test die Induzierbarkeit der AR betrachtet. Da die Induktion der Akrosomreaktion als Endpunkt der Kapazitierug betrachtet werden kann, war die Hypothese dieses Tests, daß der Anteil Spermatozoen mit AR induziert durch das Ionophor A23187 nach der Kapazitierug zunimmt.



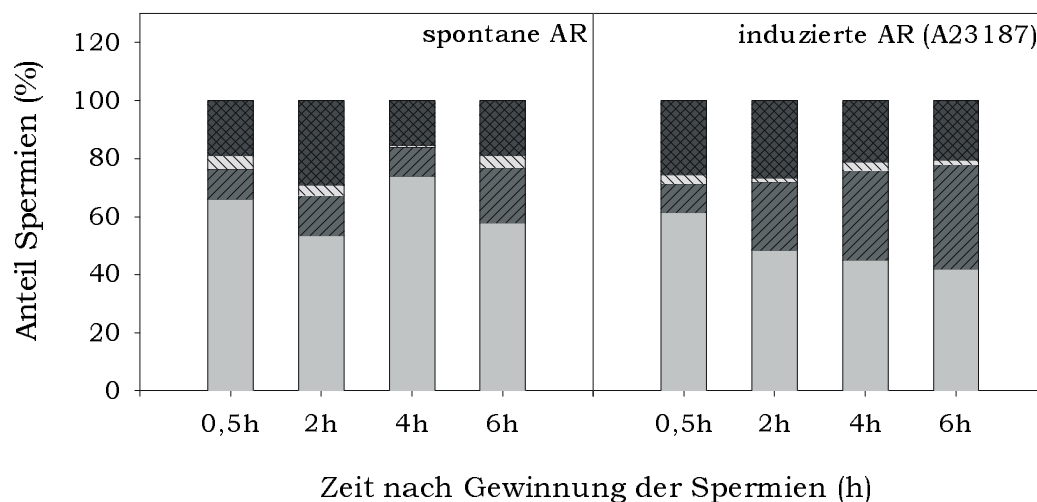
**Abb. 22** Zunahme der Spermatozoen mit AR nach Inkubation in TALPmC

Dargestellt sind Mittelwerte + SEM der lebenden spontan (hellgrau) und durch Ionophor A23187 induziert (dunkelgrau) akrosom-reagierten Spermatozoen (n = 6 bzw. 9). Signifikante Unterschiede durch \*, hochsignifikante durch \*\*\* gekennzeichnet.

Der Graph in Abb. 22 zeigt auf der linken Seite spontane (hellgrau) und induzierte (dunkelgrau) Akrosomreaktion direkt nach Gewinnung und Aufreinigung der Spermatozoen. Der Anteil spontan akrosom-reagierender Spermatozoen ( $11,2 \pm 1,5\%$ ) entspricht dem Intervall 0-1 h in Abb. 22 ( $7,9 \pm 1,1\%$ ). Die Zunahme der Spermatozoen mit AR nach der Inkubation mit dem Ionophor A23187 auf  $25,0 \pm 2,9\%$  ist signifikant ( $p < 0,005$ ). Die rechte Seite des Graphen zeigt die Anteile spontaner und induzierter AR nach 2 h Inkubation. Spontane Akrosomreaktion zeigten  $10,7 \pm 1,7\%$  der Spermatozoen, das entspricht den  $9,2 \pm 1,3\%$  des Intervalls 2-3 in Abb. 21. Nach der Induktion mit A23187 reagierten in dieser Gruppe  $35,7 \pm 2,5\%$  Spermatozoen mit AR. Auch dieser Anstieg ist signifikant ( $p < 0,005$ ). Der Unterschied im Anteil induzierter Akrosomreaktion zwischen der Gruppe ohne Inkubation (links) und der Gruppe mit 2 h Inkubation (rechts) ist ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ). Dieser Anstieg zeigt, daß bereits durch eine Kapazitierug von 2 Stunden *in vitro* eine Zunahme der Spermatozoen mit induzierter AR erreicht wurde. Daher erfolgten in allen weiteren Untersuchungen 2 h Inkubation zur Kapazitierug der Weißbüschelaffen-Spermatozoen.

Der Graph in Abb. 23 dient der Zusammenfassung der bisherigen Charakterisierung der Kapazitierug von Weißbüschelaffen-Spermatozoen *in vitro*. Die Darstellung zeigt exemplarisch für ein Tier die Verteilung der Spermatozoen auf die 4 Kategorien lebend ohne

AR (leboAR), lebend mit AR (lebmAR), tot ohne AR (totoAR), tot mit AR (totmAR) über einen Inkubationszeitraum von 6 Stunden.



**Abb. 23** Veränderungen in den 4 Kategorien während Inkubation in TALP mit Kalzium

Dargestellt ist exemplarisch für ein Tier pro Balken die Verteilung der Proben auf die 4 Kategorien in einer Probe nach verschiedenen Inkubationszeiten (%).

leboAR lebmAR totoAR totmAR

**links:** Kontrolle (spontane AR),

**rechts:** Induktion der AR mit Ionophor (5  $\mu$ M).

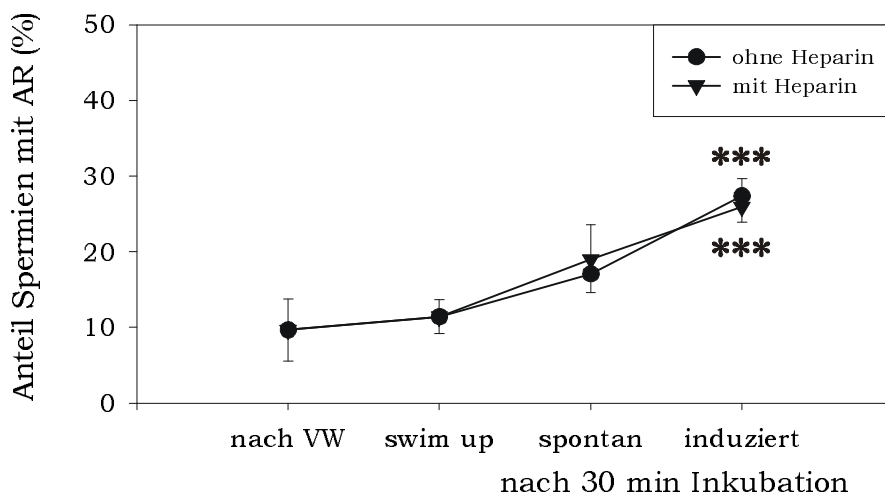
Der linke Graph zeigt die Verhältnisse in Proben ohne Ionophorbehandlung, also den Anteil lebender Spermatozoen mit spontaner Akrosomreaktion. Wie auch in Graphik der Abb. 21 ist zu erkennen, daß der Anteil spontan akrosom-reagierter Spermatozoen von 10,5% nach 0,5 h nur sehr langsam ansteigt auf 19% nach 6 h. Ein deutlicher Effekt der Inkubationszeit ist jedoch zu erkennen, wenn man die induzierte AR betrachtet. Der rechte Graph zeigt die Verteilung der Spermatozoen in den 4 Kategorien nach Inkubation und anschließender Induktion der AR mit dem Ionophor A23187. Deutlich ist die Zunahme der Spermatozoen mit AR von 10% nach 0,5 h auf 36% nach 6 h zu erkennen. Dieser Anstieg im Anteil Spermatozoen, die auf das Ionophor reagieren, beweist den Effekt der Kapazitierung *in vitro*. Tab. 4 zeigt, daß der Anteil lebender Spermatozoen über die Zeit nahezu konstant bleibt.

**Tab. 4** Anteile lebender Spermatozoen (%) im Verlauf der Inkubation

Probe	Anteil lebender Spermatozoen (%) nach Inkubation von			
	0,5 h	2 h	4 h	6 h
spontane AR	76,5%	67,5%	84,0%	77,0%
induzierte AR	71,5%	72%	76%	78%

### 3.4.2 Einfluß von Heparin

Dieser Abschnitt untersucht den kapazitierungsfördernden Effekt des Proteoglykans Heparin auf die Spermatozoen des Weißbüschelaffen. Durch Inkubation mit diesem Proteoglykan und anschließende Induktion der Akrosomreaktion mit dem Ionophor sollte der Einfluß von Heparin charakterisiert werden. Der Graph in Abb. 24 zeigt die Veränderung des Anteils lebender akrosom-reagierter Spermatozoen (spontan und induziert) über eine Inkubationszeit von insgesamt 120 min in TALP ohne (●) und mit (▼) 1 U/ml Heparin.



**Abb. 24** Einfluß von Heparin auf die Kapazitierung

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ) des Anteils spontan akrosom-reagierter Spermatozoen nach Inkubation in TALP mit Kalzium mit (▼) bzw. ohne (●) Heparin (1 U/ml) sowie der Anteil induziert akrosom-reagierter Spermatozoen nach der Inkubation mit A23187 (5  $\mu$ M). Hochsignifikante Zunahme der akrosom-reagierten Spermatozoen durch \*\*\* gekennzeichnet.

Der Anteil Spermatozoen mit spontaner Akrosomreaktion ist in den Proben nach der Gewinnung durch Vaginalspülung (VW) und nach *swim up* identisch (9,7%  $\pm$  4,1% und 11,4%  $\pm$  2,2%). Die Aufreinigung hat also keine Einfluß auf die spontane Akrosomreaktion. Auch die anschließende 30-minütige Inkubation mit bzw. ohne Heparin hat keinen wesentlichen Einfluß auf den Anteil spontan akrosom-reagierender Spermatozoen. Der Anstieg auf 19,0%  $\pm$  4,4% in der Probe mit Heparin bzw. auf 17,1%  $\pm$  6,5% in der Probe ohne Heparin ist aufgrund der großen Varianz in den Daten nicht signifikant. Auch bestand kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ohne und der Testgruppe mit Heparin.

Um den Einfluß des Proteoglykans auf die Kapazitierung zu charakterisieren, wurde jeweils in einem Aliquot nach Inkubation mit bzw. ohne Heparin die Akrosomreaktion mit dem Ionophor A23187 induziert. Die Daten zeigen, daß diese Induktion zu einem signifikanten Anstieg der Spermatozoen mit AR führte. In der Kontrollgruppe ohne Heparin stieg der Anteil lebender Spermatozoen mit Akrosomreaktion signifikant von 11,4%  $\pm$  2,2% nach *swim up* auf 27,4%  $\pm$

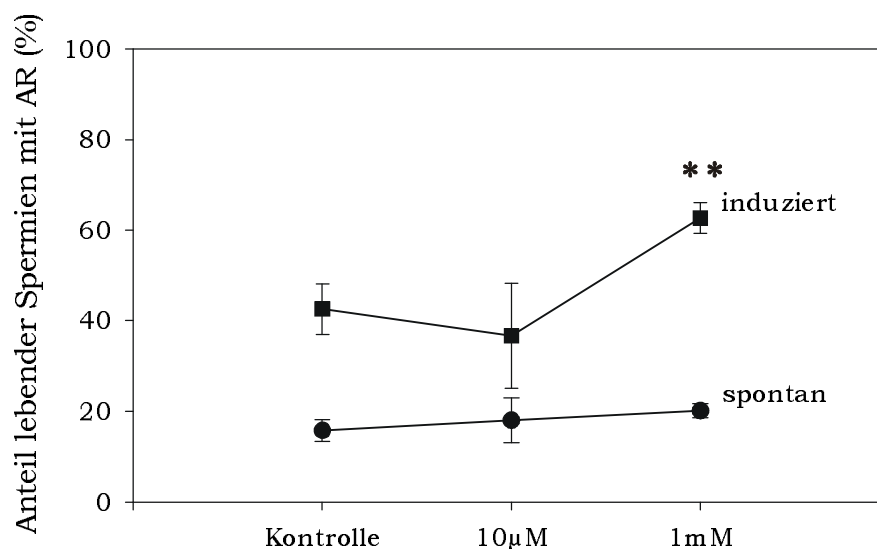
2,3% ( $p < 0,005$ ). In der Testgruppe mit Heparin zeigten  $25,9\% \pm 2,0\%$  der Spermatozoen induzierte AR ( $p < 0,005$ ).

Da zwischen der Kontrollgruppe und der Testgruppe kein signifikanter Unterschied im Anteil lebender Spermatozoen mit AR (spontan und induziert) besteht, kann ein Effekt von Heparin ausgeschlossen werden.

### 3.4.3 Einfluß von cAMP und Coffein

*In vitro* führt die Inkubation der Spermatozoen von *Macaca mulatta* mit dem *second-messenger*-Molekül cAMP und dem Phosphodiesterase-Inhibitor Coffein zu einer Steigerung des Befruchtungserfolges um 100% (Bavister et al., 1983) und zu einer Erhöhung des Anteils der Spermatozoen, die positiv auf die Induktion der AR reagieren bei *Macaca fascicularis* (VandeVoort et al., 1995). Im folgenden Abschnitt sollte untersucht werden, ob auch bei Spermatozoen des Weißbüschelaffen ein kapazitierungsfördernder Effekt von Coffein und cAMP nachweisbar ist.

Die Graphik in Abb. 25 zeigt den Anteil Spermatozoen mit Akrosomreaktion (spontan und induziert) nach Kapazitierung (90 min) und 30 min Inkubation in TALP-Medium mit 2 mM Kalzium und Zusatz von Coffein und dbcAMP in den Endkonzentrationen von jeweils 0 M, 10  $\mu$ M und 1 mM.



**Abb. 25** Einfluß von Coffein und cAMP in Kombination auf Kapazitierung in TALPmC

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ) für spontane ( $\bullet$ ) und induzierte ( $\blacksquare$ ) AR nach Inkubation ohne, jeweils mit 10  $\mu$ M und jeweils mit 1 mM Coffein und dbcAMP. Sig. Anstieg durch \*\* gekennzeichnet ( $p < 0,01$ ).

Die untere Kurve veranschaulicht den Verlauf der spontanen AR. In der Kontrollgruppe zeigten  $15,8\% \pm 2,4\%$  Spermatozoen spontane AR. Nach der Inkubation mit Coffein und dbcAMP in einer Endkonzentration von jeweils 10  $\mu$ M reagierten  $18,0\% \pm 5,0\%$  der Spermatozoen mit spontaner AR und nach der Inkubation mit 1 mM betrug der Anteil lebender

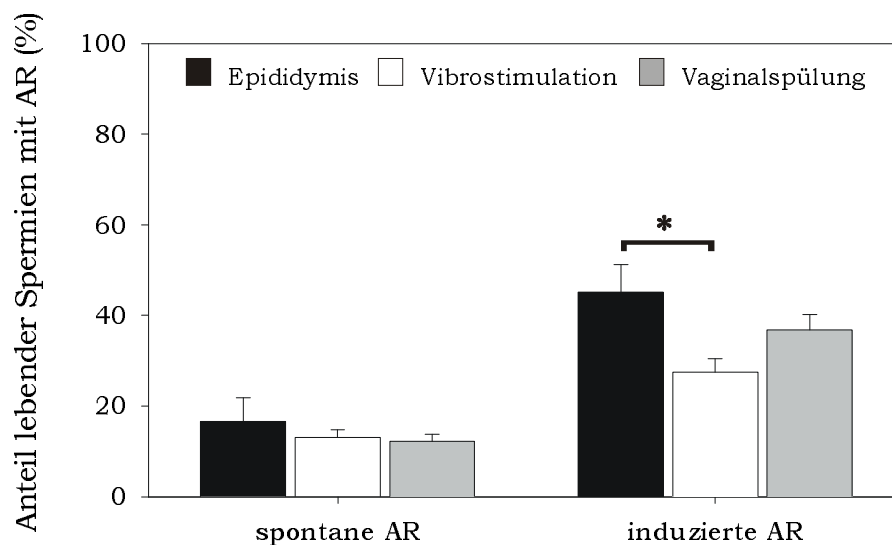


Spermatozoen mit spontaner AR  $20,1\% \pm 3,4\%$ . Diese Unterschiede sind aufgrund der relativ großen Streubreite der Daten nicht signifikant, die spontane AR wird durch die Inkubation mit Coffein und dbcAMP nicht beeinflusst.

Deutlich wird ein Einfluß der beiden Moleküle, wenn man die Induzierbarkeit der AR betrachtet. Die obere Kurve zeigt die Zunahme des Anteils Spermatozoen, die mit AR auf die Inkubation mit dem Kalziumionophor A23187 reagieren in Abhängigkeit von der Konzentration von cAMP und Coffein im Medium. Während in der Kontrollgruppe  $42,6\% \pm 5,6\%$  Spermatozoen induzierte AR zeigten und nach der Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  Coffein und dbcAMP keine Veränderung zu beobachten ist ( $36,7\% \pm 11,6\%$ ), kommt es nach der Inkubation mit je  $1 \text{ mM}$  Coffein und dbcAMP zu einem signifikanten Anstieg der induzierten AR auf  $62,8\% \pm 3,4\%$  ( $p < 0,01$ ). Dieser signifikante Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe läßt einen kapazitierungsfördernden Effekt von Coffein und dbcAMP vermuten.

#### 3.4.4 Einfluß der Methode der Spermatozoengewinnung

Die verschiedenen Methoden, durch die beim Weißbüschelaffen Spermatozoen gewonnen werden können, haben möglicherweise unterschiedlichen Einfluß auf die Kapazitierung *in vitro*. Daher soll im Folgenden die Induzierbarkeit der AR in Abhängigkeit von der Gewinnungsmethode der Spermatozoen verglichen werden.



**Abb. 26** Einfluß der Gewinnungsmethode auf die Kapazitierung in TALPmC

Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM ( $n = 6/7/12$ ) für spontane (links) und induzierte (rechts) AR für die verschiedenen Expositionen. Signifikanter Unterschied durch \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

Der Graph in Abb. 26 zeigt die Anteile Spermatozoen mit spontaner (links) und induzierter (rechts) Akrosomreaktion für die drei verschiedenen Gewinnungsmethoden nach jeweils 2 h Inkubation in TALPmC.

Betrachtet man die spontane Akrosomreaktion (linke Seite), so läßt sich zwischen den drei Gruppen kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Spermatozoengewinnung erkennen (Epididymis:  $16,6\% \pm 5,2\%$ ; Vibrostimulation:  $13,1\% \pm 1,6\%$ ; Vaginalspülung:  $12,3\% \pm 1,5\%$ ).

Deutliche Unterschiede zwischen den Gewinnungsmethoden in der Reaktion auf das Ionophor A23187 sind zu erkennen, betrachtet man die rechte Seite der Abbildung. Nach 2 h Kapazitierug zeigten in der Gruppe der epididymalen Spermatozoen  $45,1\% \pm 6,2\%$  ( $n = 6$ ) induzierte Akrosomreaktion. In der Testgruppe gewonnen durch Vibrostimulation reagierten  $27,5\% \pm 2,8\%$  ( $n = 7$ ) der Spermatozoen mit AR auf die Inkubation mit dem Ionophor. In der Gruppe Vaginalspülung reagierten nach der Kapazitierug *in vitro*  $36,8\% \pm 3,4\%$  der Spermatozoen mit einer ionophor-induzierten AR.

Der Vergleich dieser drei Testgruppen in einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) zeigte einen signifikanten Unterschied im Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen. Der Tukey Test (post-hoc) kennzeichnete diesen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe „Epididymis“ (■) und der Gruppe „Vibrostimulation“ (□) ( $p < 0,05$ ). Die Unterschiede in der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion dokumentieren einen unterschiedlichen Verlauf der Kapazitierug *in vitro* nach den verschiedenen Gewinnungsmethoden.

Mögliche Ursache für die unterschiedliche Kapazitierug ist die Exposition zu verschiedenen Sekreten des weiblichen und männlichen Genitaltraktes. Spermatozoen, die direkt aus dem Nebenhoden (Epididymis) gewonnen werden, sind weder zu Seminalplasma noch zu Sekreten des weiblichen Genitaltraktes exponiert. Dagegen werden durch die Methode der Vibrostimulation Spermatozoen in Kombination mit Seminalplasma gewonnen. Die natürlich ejakulierten Proben, die durch Vaginalspülung gesammelt werden können, standen in Kontakt zu weiblichen und männlichen Sekreten.

## Untersuchungen zum Einfluß von Kalzium *in vitro*

Kalzium spielt eine zentrale Rolle bei der Befruchtung der Eizelle durch das Spermatozoon, allerdings bestehen Unterschiede im Kalziumbedarf zwischen den einzelnen Teilschritten des Befruchtungsprozesses. Im folgenden Abschnitt soll der Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf verschiedene Teilprozesse untersucht und die Rolle von intrazellulärem Kalzium charakterisiert werden.

### 3.5 Einfluß von extrazellulärem Kalzium

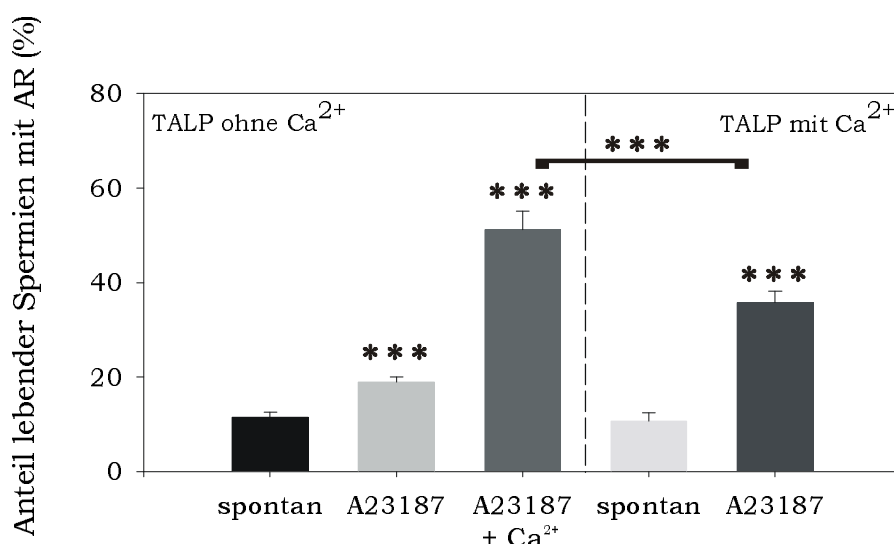
Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des Kalziumbedarfes der Weißbüschelaffen-Spermatozoen *in vitro*. Aus diesem Grund wurde der Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf Kapazitierug und Akrosomreaktion, auf die Proteinphosphorylierung als Teilereignis der Kapazitierug und auf die Bindung der Spermatozoen an die *Zona pellucida* charakterisiert.

### 3.5.1 auf Kapazitiering und Akrosomreaktion

Kapazitiering und Akrosomreaktion unterschieden sich bei Spermatozoen verschiedener Spezies hinsichtlich des Kalziumbedarfes. Deshalb wurde in der folgenden Untersuchung die Kapazitiering in Bezug auf die Präsenz von extrazellulärem Kalzium streng von der Akrosomreaktion getrennt. Diese Trennung wurde durch das im Kapitel „Material & Methoden“ unter 2.5.1 beschriebene Protokoll ermoglicht (siehe Abb. 11).

#### Vergleich der Kapazitiering in TALPoC und TALPmC

Die Graphik der Abb. 27 zeigt die Anteile lebender akrosom-reagierter Spermatozoen nach der Inkubation in TALP ohne Zusatz von Kalzium (linke Seite) bzw. in TALP mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (rechte Seite). Nach 2 h Kapazitiering in TALPoC zeigten  $11,5\% \pm 1,0\%$  der Spermatozoen spontane Akrosomreaktion. Wurde ein Aliquot der Probe nach der Kapazitiering mit dem Ionophor A23187 (5  $\mu\text{M}$ ) behandelt, reagierten  $18,9\% \pm 1,2\%$  Spermatozoen mit Akrosomreaktion, der Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen stieg signifikant um  $8,5\% \pm 1,1\%$  ( $p < 0,005$ ). Einem zweiten Aliquot der gleichen Probe wurde nach 2 h Kapazitiering in TALPoC zeitgleich mit dem Ionophor eine Stammlösung  $\text{Ca}^{2+}$  zugesetzt, so daß die Endkonzentration 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  betrug. Nach der Induktion waren  $51,3\% \pm 3,8\%$  Spermatozoen akrosom-reagiert (dritter Balken). Auch dieser Anstieg ist Vergleich zur Kontrollgruppe mit spontaner AR signifikant ( $p < 0,005$ ). Betrachtet man die Verhältnisse nach der Inkubation in TALPmC (rechte Seite), so ist deutlich zu erkennen, daß der Anteil Spermatozoen mit induzierter AR im Vergleich zum Anteil mit spontaner AR signifikant höher liegt ( $10,7\% \pm 1,7\%$  vs.  $35,7\% \pm 2,5\%$ ;  $p < 0,001$ ). Dies entspricht den Ergebnissen der in Abb. 26 dargestellten Untersuchungen an Spermatozoen nach Vaginalspülung.



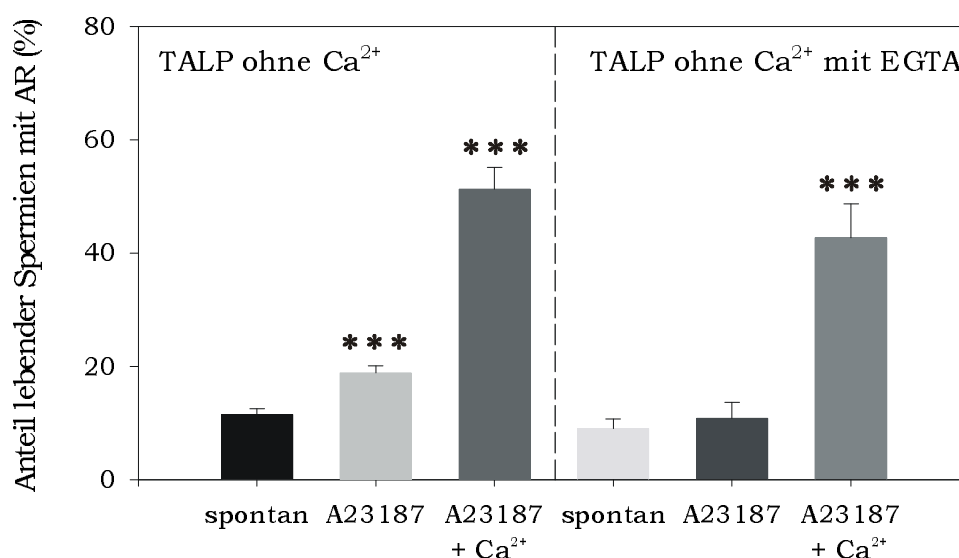
**Abb. 27** Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf Kapazitiering und Akrosomreaktion

Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der Anteile Spermatozoen mit spontaner bzw. A23187-induzierter AR nach Inkubation in TALPoC ( $n = 13$ ) bzw. TALPmC ( $n = 9$ ). Signifikante Unterschiede durch \*\*\* gekennzeichnet.

Beim Vergleich der induzierten AR nach Inkubation in TALPmC und in TALPoC fällt auf, daß nach der Kapazitierung ohne Kalzium und Induktion mit A23187 + 2 mM Kalzium ein höherer Anteil Spermatozoen mit Akrosomreaktion reagiert ( $51,3\% \pm 3,8\%$  vs.  $35,7\% \pm 2,5\%$ ;  $p < 0,005$ ).

#### Vergleich der Kapazitierung in TALPoC und TALPmEGTA

Da durch den Zusatz von BSA zum Medium und die Freisetzung von Kalzium aus absterbenden Spermatozoen die Präsenz von minimalen Kalziumkonzentrationen nicht völlig ausgeschlossen werden konnte, wurde in einem Kontrollexperiment der Kalziumchelator EGTA eingesetzt. Die Abb. 28 zeigt auf der rechten Seite die Anteile akrosom-reagierter Spermatozoen nach 2 h Kapazitierung in TALPmEGTA, ein absolut kalziumfreies Medium. Rechts sind zum Vergleich die Verhältnisse in TALPoC dargestellt (wie Abb. 27).



#### **Abb. 28** Kapazitierung und Akrosomreaktion in kalziumfreiem TALP

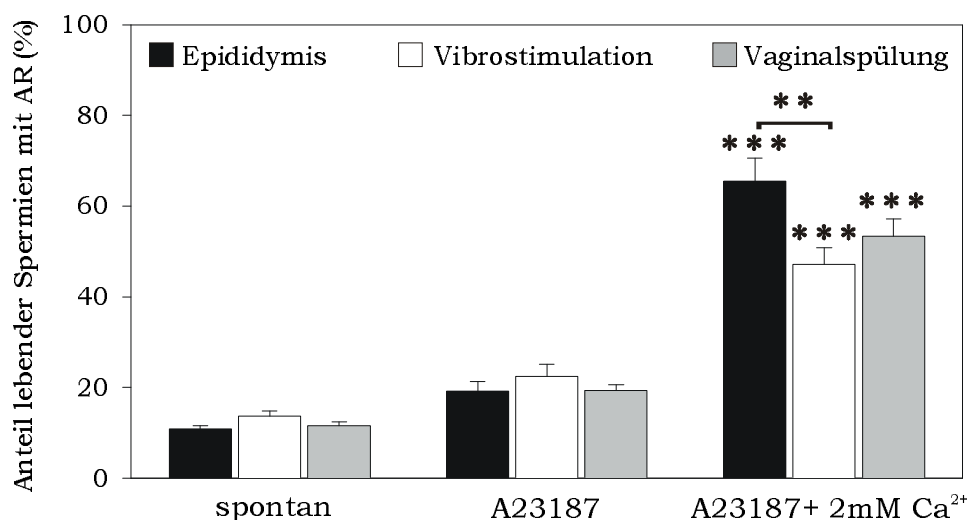
Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der Anteile Spermatozoen mit spontaner bzw. A23187-induzierter AR nach Inkubation in TALPoC (n = 13) bzw. TALPmEGTA (n = 6). Signifikante Unterschiede durch \*\*\* gekennzeichnet

Nach der Inkubation in TALPmEGTA war durch die Induktion mit A23187 (Balken 5) im Vergleich zum Anteil spontan akrosom-reagierter Spermatozoen kein Unterschied zu beobachten ( $9,0\% \pm 1,7\%$  vs.  $10,8\% \pm 2,8\%$ ). Wurde dagegen zeitgleich mit dem Ionophor Kalzium (Endkonzentration 2 mM) zur Probe zugegeben (Balken 6), zeigten nach der Kapazitierung in absolut kalziumfreiem Medium  $42,7\% \pm 6,0\%$  der Spermatozoen induzierte AR. Der Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe mit spontaner AR betrug  $33,7\% \pm 6,0\%$  ( $p < 0,003$ ). Diese Zunahme entspricht dem Anstieg der akrosom-reagierten Spermatozoen auf  $51,3\% \pm 3,8\%$  nach Kapazitierung in TALPoC (linker Teil der Graphik), der Unterschied im Anteil induzierter AR nach Kapazitierung in TALPoC und in TALPmEGTA ist nicht signifikant.

In Kontrollexperimenten wurde nach 2 h Kapazitierug in TALPoC der Anteil Spermatozoen mit induzierter AR nach dem Zusatz von Kalzium (2 mM) und dem Zusatz von Kalzium und DMSO (Lösungsmittel des Ionophors) bestimmt. Der Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen nach der Inkubation mit Kalzium ( $12,0\% \pm 1,7\%$ ) bzw. der Inkubation mit DMSO +  $\text{Ca}^{2+}$  ( $18,7\% \pm 3,2\%$ ) ist nicht signifikant verschieden vom Anteil spontan akrosom-reagierter Spermatozoen. So kann ausgeschlossen werden, daß die oben beschriebene Zunahme der Spermatozoen mit AR durch Kalzium oder durch DMSO allein bedingt wird, sondern es handelt sich um Effekte von Kalzium in Kombination mit der Induktion der AR durch das Kalziumionophor.

#### Vergleich der Kapazitierug in TALPoC für die drei Gewinnungsmethoden

Der Effekt von extrazellulärem Kalzium auf Kapazitierug und Akrosomreaktion *in vitro* von Spermatozoen, die durch die drei verschiedenen Methoden gewonnen wurden, soll in der Abb. 29 verglichen werden. Die Graphik zeigt die Anteile Spermatozoen mit spontaner bzw. induzierter AR nach Kapazitierug in TALPoC für Spermatozoen nach VW (□), PVS (□) und direkt aus der Epididymis (■). Dargestellt sind die Anteile Spermatozoen mit spontaner Akrosomreaktion (linke Gruppe), der Anteil AR nach der Inkubation mit dem Ionophor allein (mittlere Gruppe) sowie der Anteil Spermatozoen mit AR nach der Inkubation mit A23187 in Kombination mit  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) in der rechten Gruppe.



**Abb. 29** Kapazitierug und AR in TALPoC nach verschiedenen Gewinnungsmethoden.

Dargestellt sind Mittelwerte + SEM der Spermatozoen mit spontaner bzw. induzierter AR. Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch \*\* bzw. \*\*\* gekennzeichnet.

Bei Betrachtung der Graphik ist für alle drei Gewinnungsmethoden das gleiche Muster erkennbar: geringer Anteil Spermatozoen mit spontaner AR (Epididymis:  $10,8\% \pm 0,8\%$ ; PVS:  $13,7\% \pm 1,2\%$ ; VW:  $11,5\% \pm 0,9\%$ ), kein statistisch signifikanter Unterschied nach der Inkubation mit dem Ionophor (Epididymis:  $19,2\% \pm 2,1\%$ ; PVS:  $22,4\% \pm 2,6\%$ ; VW:  $19,3\% \pm 1,4\%$ ) und deutliche signifikante Zunahme in allen drei Gruppen nach der Induktion der AR

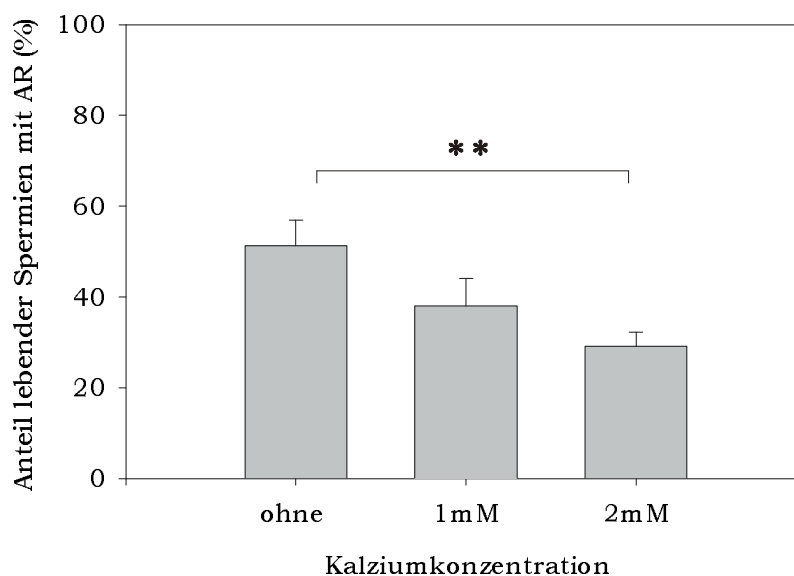
mit Ionophor und 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe mit spontaner AR (Epididymis:  $65,6\% \pm 4,9\%$ ,  $p < 0,005$ ; PVS:  $47,1\% \pm 3,7\%$ ,  $p < 0,005$ ; VW:  $53,4\% \pm 3,8\%$ ,  $p < 0,005$ ).

Auch der bereits in Abb. 26 gezeigte Einfluß der Exposition zu den unterschiedlichen Sekreten ist in dieser Graphik wieder erkennbar: während in den Proben der Nebenhoden-Spermatozoen  $65,6\% \pm 4,9\%$  der Spermatozoen induzierte AR zeigten, reagierten nach der PVS nur  $47,1\% \pm 3,7\%$  Spermatozoen mit AR auf die Induktion mit A23187 nach 2 h Kapazitiering ( $p < 0,01$ ).

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß die Kapazitiering *in vitro* ohne extrazelluläres Kalzium unabhängig ist von der Exposition zu Sekreten des weiblichen und/oder männlichen Genitaltraktes.

#### Vergleich verschiedener Konzentrationen von extrazellulärem Kalzium

Die Ergebnisse der Abbildungen 27 lassen einen inhibitorischen Effekt von extrazellulärem Kalzium auf die Kapazitiering vermuten, da der Anteil Spermatozoen mit induzierter AR nach Kapazitiering in TAPLMC geringer ist als nach Kapazitiering in TALPoC. Dies scheint unabhängig von der Gewinnungsmethode zu sein (vgl. Abb. 29). Um diese Beobachtung zu prüfen, wurden Spermatozoen nach VW in TALP mit unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen (0, 1 und 2 mM) kapazitiert. Der Graph in Abb. 30 zeigt die Anteile Spermatozoen mit A23187-induzierter AR nach der Kapazitiering. Während der Induktion der AR war die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in allen Gruppen gleich (2 mM).



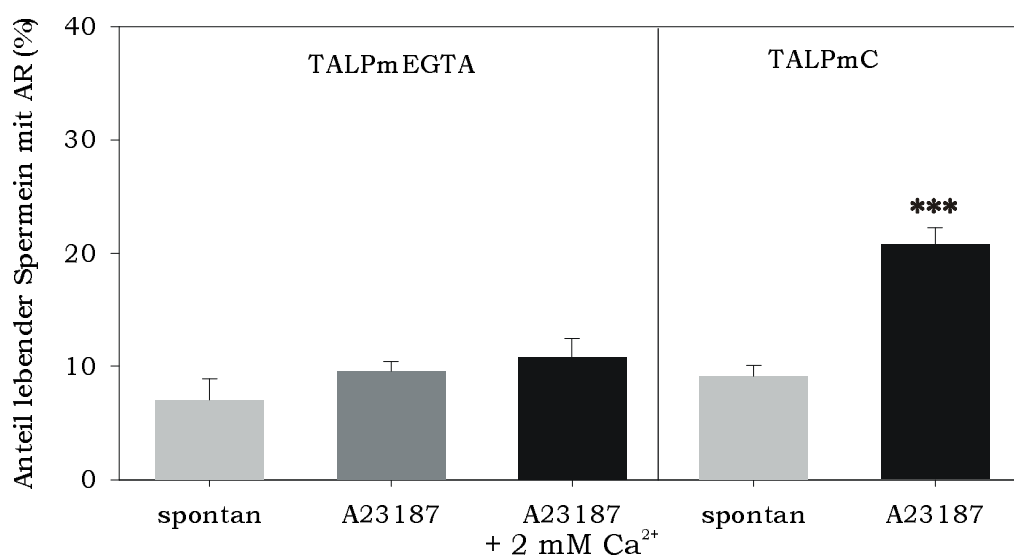
**Abb. 30** Kapazitiering und AR in Abhängigkeit der extrazellulären Kalziumkonzentration

Dargestellt ist der Anteil Spermatozoen mit induzierter AR mit A23187 und 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nach der Kapazitiering in TALP mit 0, 1 und 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n=6$ ). Signifikante Unterschiede mit \*\* gekennzeichnet.

Nach der Inkubation in TALPoC zeigten  $51,3\% \pm 5,7\%$  Spermatozoen AR, nach der Kapazitierung mit 1 mM Kalzium im Medium nur  $38,0\% \pm 6,1\%$  und nach Inkubation mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  kam es zu einer signifikanten Abnahme auf  $29,1\% \pm 3,1\%$  Spermatozoen mit induzierter AR ( $p < 0,01$ ).

#### Vergleich der Kapazitierung in TALPmEGTA und TALPmC humaner Spermatozoen

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Protokoll ermöglicht die getrennte Beurteilung des Kalziumbedarfes für Kapazitierung und Akrosomreaktion. Um dieses Verfahren zu validieren, wurden humane Spermatozoen verwendet, deren Kalziumbedarf während der Kapazitierung bereits charakterisiert wurde (siehe Einleitung). Die Ergebnisse dieser Kontrollversuche sind in der Graphik der Abb. 31 dargestellt. Die linke Seite zeigt den Anteil Spermatozoen mit spontaner und induzierter AR nach Kapazitierung in TALPmEGTA unter völlig kalziumfreien Bedingungen. Die rechte Graphikseite demonstriert den Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen nach Kapazitierung in TALPmC.



**Abb. 31** Einfluß von Kalzium auf Kapazitierung und AR humaner Spermatozoen

Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der Anteile Spermatozoen mit spontaner bzw. induzierter AR nach 2 h Inkubation in den verschiedenen Medien ( $n = 5-8$ ). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,005$ ) sind durch \*\*\* gekennzeichnet.

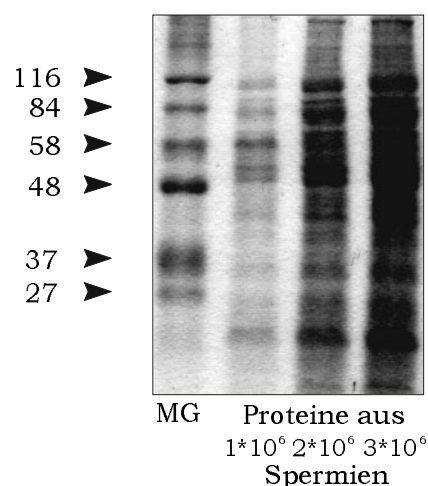
Während nach der Kapazitierung in TALPmEGTA auch nach Zusatz von Kalzium parallel zum Ionophor kein Anstieg der AR zu beobachten ist, nimmt der Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen nach Kapazitierung und Induktion mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  signifikant zu ( $9,1 \pm 0,9\%$  vs.  $20,8 \pm 1,5\%$ ;  $p < 0,001$ ).

### 3.5.2 auf die Proteinphosphorylierung

Die Phosphorylierung von Spermatozoenproteinen an der Aminosäure (AS) Tyrosin ist ein mit der Kapazitierung assoziiert Ereignis, das einen weiteren Parameter darstellt, mit dem der Einfluß von extrazellulärem Kalzium bestimmt werden kann. Der folgende Abschnitt beschreibt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

#### Extraktion

Der erste Schritt war das Austesten verschiedener Extraktionsmethoden und die Etablierung des für die Proteine von Weißbüschelaffen-Spermatozoen geeigneten Protokolls (siehe Kapitel „Material und Methoden“, Abschnitt 2.5.2.2). An dieses Protokoll bestanden zwei Anforderungen: 1. die Erfassung eines möglichst breiten Spektrums an Spermatozoenproteinen und 2. die Extraktion konstanter Proteinmengen, um das Beladen der Gele mit konstanten Proteinmengen zu sichern. Die Abbildung 32 zeigt die gescannte Kopie ein SDS-Geles nach Färbung mit Coomassie blau und Trocknung auf dem Gelrockner. In dieser Darstellung wird das Spektrum der extrahierten Proteine deutlich. Mit dem etablierten Protokoll wurden aus den Spermatozoen von *Callithrix jacchus* Proteine im Bereich von ca. 20 bis ca. 200 kD extrahiert. Die Abbildung zeigt außerdem, daß eine Zusammenhang zwischen der Proteinmenge und der Zahl der zur Extraktion eingesetzten Spermatozoen besteht. Die Banden 2, 3 und 4 zeigen die aufgetrennten Proteine aus  $1 \cdot 10^6$ ,  $2 \cdot 10^6$  bzw.  $3 \cdot 10^6$  Spermatozoen. Beim Vergleich der 3 Banden ist eine deutlich Zunahme der Intensität zu erkennen. Eine konstante Reproduzierbarkeit dieses Musters erlaubt den Schluß, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Spermatozoenzahl und der Menge extrahierter Proteine besteht. Somit konnte durch die Extraktion aus einer konstanten Spermatozoenzahl in allen Experimenten die Beladung der Gele mit konstanten Proteinmengen abgesichert werden.



**Abb.32** Kopie eines SDS-Geles nach Coomassie-Färbung und Trocknung

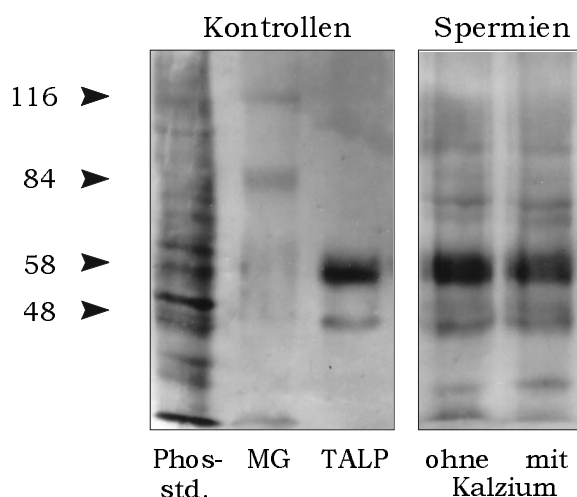
Die Pfeile und Zahlen markieren die Proteingrößen (in kDa) des Molekulargewichtsmarkers (MG).



In einem Vorversuch sollte überprüft werden, ob die Proteinphosphorylierung tatsächlich ein mit der Kapazitierang assoziiertes Ereignis ist. Dazu wurden Spermatozoen nach VW in TALP-Medium ohne Rinderserum-Albumin (engl.: *bovine serum albumin*, BSA), das für die Kapazitierang notwendig ist, inkubiert. Nach Proteinextraktion, Gelelektrophorese und Western Blot wurden die auf die Membran übertragenen Proteine mit dem phosphorylierungsspezifischen Antikörper behandelt. Nach der Inkubation mit dem ECL-Kit wurden die Lichtsignale auf Röntgenfilmen aufgefangen und ausgewertet. Auf den Filmen waren allerdings nur in den Positivkontrollen deutliche Signale erkennbar (ohne Abbildung). Daß heißt, *in vitro* erfolgt die Phosphorylierung der Proteine von Weißbüschelaffen-Spermatozoen nicht, wenn BSA im Inkubationsmedium fehlt. Da BSA zu den kapazitierangsfördernden Substanzen gehört, läßt dieses Ergebnis vermuten, daß es sich bei der Proteinphosphorylierung bei *Callithrix jacchus* tatsächlich um ein mit der Kapazitierang *in vitro* assoziiertes Ereignis handelt.

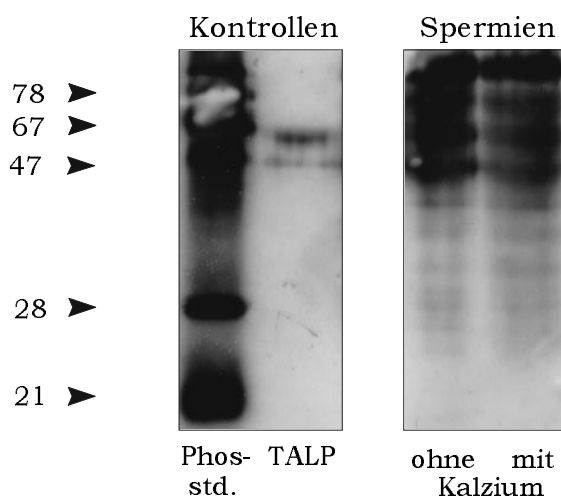
Zur Untersuchung des Einflusses von extrazellulärem Kalzium auf die Proteinphosphorylierung *in vitro* wurden nach 2 h Inkubation in TALPoC bzw. TALPmC Spermatozoenproteine aus  $3 \cdot 10^6$  Spermatozoen extrahiert, in der Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western Blot mit dem spezifischen Antikörper für die Proteinphosphorylierung an der AS Tyrosin markiert. Nach der Behandlung mit dem ECL-Kit waren auf dem Röntgenfilm deutliche Signale erkennbar, die im Anschluß ausgewertet wurden.

Die Abbildung 33 zeigt exemplarisch für 6 Versuche die gescannte Kopie eines solchen Röntgenfilmes. Auf der linken Seite der Abbildung sind die mitgeführten Kontrollen bzw. Standards zu erkennen, rechts die Testgruppen nach Inkubation im Medium ohne bzw. mit Kalzium. Die erste Bande zeigt die Signale von phosphorylierten Proteinen einer kommerziellen Positivkontrolle (Upstate Biotechnology), die der Überprüfung des Antikörpers diente. In der zweiten Bande wurde der Molekulargewichtsmarker SDS-7B (SIGMA) aufgetragen, durch den die einzelnen Proteine anhand des Molekulargewichtes identifiziert werden können. In der dritten Bande wurde als Negativkontrolle das Proteinextrakt aus 100 µl Medium (TALP) aufgetragen. Das Signal entspricht dem im Medium enthaltenen Protein BSA. Auf der rechten Seite sind die Signale der Spermatozoen des Weißbüschelaffen nach Kapazitierang in TALP mit bzw. ohne Kalzium jeweils mit BSA zu erkennen. Die linke Bande zeigt die positiv markierten Proteine nach der Inkubation in TALPoC, die rechte Bande nach Inkubation in TALPmC. Bei der Betrachtung wird deutlich, daß in keiner Proteinbande des ausgewählten Bereiches (Proteine von ca. 20 bis ca. 90 kDa) Unterschiede in der Stärke des ECL-Signales bestehen. Das heißt, daß die Phosphorylierung der Proteine der Spermatozoen des Weißbüschelaffen *in vitro* unabhängig von extrazellulärem Kalzium im Medium verläuft. Die Beladung der Bahnen mit gleichen Proteinmengen wurde durch die Ponceau-Färbung der Membranen nach dem Western Blot überprüft. Nur Membranen, die nach dieser allgemeinen Markierung von Proteinen in allen Bahnen Signale gleicher Intensität zeigten, wurde in die Immunodetektion eingesetzt.



**Abb. 33** Proteinphosphorylierung in Spermatozoen von *C. jacchus* in Abhängigkeit von extrazellulärem Kalzium (Kopie Röntgenfilm)  
Pfeile und Zahlen markieren die bekannten Proteingrößen (in kDa) des Molekulargewichtsmarkers (MG).  
**links:** 1. Bahn: Positivkontrolle „Phosphostandard“ (Phosstd.), 2. Bahn: Molekulargewichtsmarker (MG), 3. Bahn: Negativkontrolle (TALP).  
**rechts:** 1. Bahn: Testgruppe in TALPoC, 2. Bahn: Testgruppe in TALPmC.

Zur Überprüfung des etablierten Protokolls wurden humane Spermatozoen in den gleichen Versuchsablauf eingesetzt. Abbildung 34 zeigt exemplarisch für insgesamt 6 Proben die Ergebnisse dieser Kontrollelexperimente.



**Abb. 34** Proteinphosphorylierung in humanen Spermatozoen  
Pfeile und Zahlen markieren die bekannten Proteingrößen (in kDa) des Molekulargewichtsmarkers (MG).  
**links:** 1. Bahn: Positivkontrolle „Phosphostandard“ (Phosstd.), 2. Bahn: Negativkontrolle (TALP).  
**rechts:** 1. Bahn: Testgruppe in TALPoC, 2. Bahn: Testgruppe in TALPmC.

Auf der linken Seite sind die Signale von Positiv- und Negativkontrolle zu erkennen. Der Phosphorylierungsstandard (Positivkontrolle) zeigt deutliche Signale im Bereich von 21 bis 78 kDa. Das Extrakt aus dem Medium (TALP) zeigt ein Signal, das in seinem Molekulargewicht dem von BSA entspricht. Auf der rechten Seite sind die Banden der Proteine der 2 Testgruppen zu erkennen: links in TALPoC und rechts in TALPmC. Besonders deutlich sind die Proteine im Bereich von ca. 40 bis ca. 90 kDa. Auch hier lassen sich, wie schon in den Proben der Spermatozoen des Weißbüschelaffen (siehe oben), keine Unterschiede in der Stärke der ECL-Signale erkennen. Daß heißt, die Phosphorylierung der Proteine humaner Spermatozoen verläuft *in vitro* unabhängig von extrazellulärem Kalzium. Dieses Ergebnis entspricht den Daten der Arbeit von Emillozzi & Fenichel (1997), so daß das in der vorliegenden Arbeit etablierte Protokoll damit bestätigt werden konnte.

### 3.5.3 auf Bindungsfähigkeit an die *Zona pellucida*

Die Beurteilung der Bindungsfähigkeit von Spermatozoen an die Eizelle ist ein wichtiger Parameter bei der Charakterisierung von Spermatozoen *in vitro*.

In Vorversuchen wurde die Bindungsaffinität der Spermatozoen des Weißbüschelaffen an Mausooocyten untersucht, um ein praktikables Testsystem entwickeln zu können. Tab. 5 zeigt die Ergebnisse der intra- und interspezifischen Bindungsversuche in alle Kombinationen zwischen Maus und *C. jacchus* für jeweils 20 Eizellen. Die Spermatozoen wurden zuvor 2 h im Medium zur Kapazitierung inkubiert.

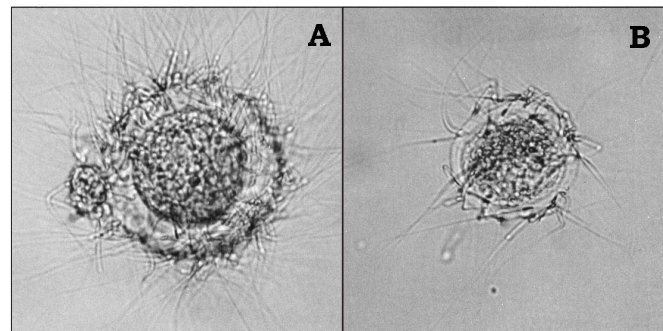
**Tab. 5** Bindungsaffinität für alle Kombinationen zwischen Maus und *C. jacchus*

Eizelle Spermatozoen	Maus	<i>Callithrix jacchus</i>
Maus	hohe Affinität	hohe Affinität
<i>Callithrix jacchus</i>	keine Affinität	hohe Affinität

Wie Tabelle 5 zeigt, binden die Spermatozoen des Weißbüschelaffen nicht an Mausooocyten. Daher mußte für die Tests zur Bindungsaffinität der Spermatozoen von *Callithrix jacchus* eine Protokoll mit arteigenen Eizellen etabliert werden.

Die Bindung von Mausspermatozoen dagegen scheint im Vergleich zur Bindungsaffinität der Spermatozoen des Weißbüschelaffen nicht so strikt artspezifisch zu sein. Abb. 35 zeigt exemplarisch eine Eizelle Maus (links) und eine Eizelle Weißbüschelaffe (rechts), nach der Inkubation mit Mausspermatozoen unter gleichen Bedingungen. In beiden Fällen ist die Bindung der Spermatozoen an die Eizelle deutlich demonstriert. Auch die Unterschiede in der

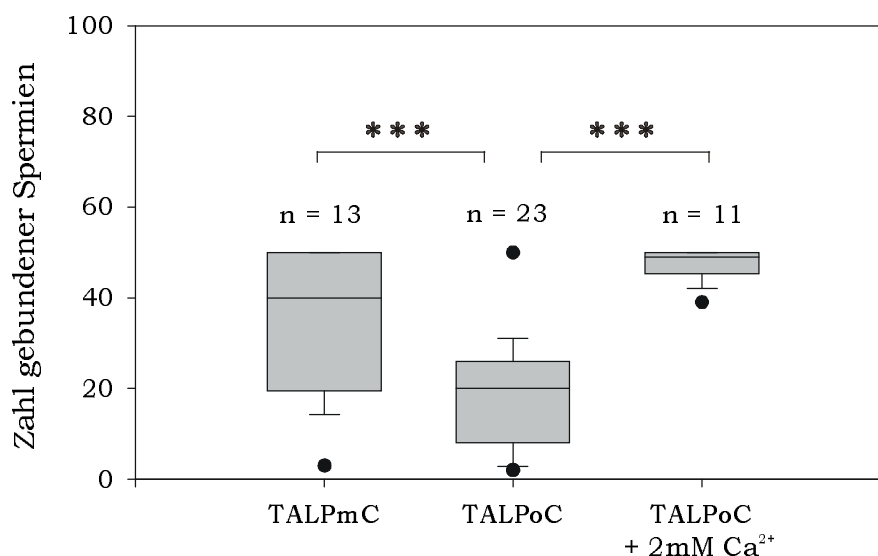
Eizell-Morphologie sind deutlich zu erkennen. Während die Eizelle der Maus nur von einer dünnen *Zona pellucida* umgeben wird, ist diese bei den Eizellen von *C. jacchus* deutlich dicker.



**Abb. 35** Eizellen nach Test zur Bindungsfähigkeit von Mausspermatozoen  
**links:** Maus – Maus; **rechts:** *Callithrix jacchus* – Maus

Die Ergebnisse der Tabelle 5 zeigen, daß Mauseizellen nicht eingesetzt werden können, um die Bindungsfähigkeit der Spermatozoen von *C. jacchus* nach Kapazitierung *in vitro* zu testen. Deshalb mußte ein Protokoll entwickelt werden, in dem arteigene Eizellen zum Einsatz kamen. Da die Gewinnung von Eizellen und Spermatozoen am gleichen Versuchstag organisatorisch schwierig ist, wurde die Bindungsaffinität mittels salzgelagerter Eizellen des Weißbüschelaffen getestet.

Der Graph in Abb. 36 zeigt die Ergebnisse der Bindungstest für Spermatozoen gewonnen durch VW mit salzgelagerten Eizellen von *Callithrix jacchus*.



**Abb. 36** Bindungsfähigkeit von Spermatozoen nach *vaginal washing* in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration.

Dargestellt ist die Anzahl gebundener Spermatozoen für jede Eizelle (n=11 bis n=23) sowie der Median mit den 10%, 25%, 75%, 90% Perzentilen. Signifikante Unterschiede durch \*\*\* gekennzeichnet.

Dargestellt sind im Boxplot die Zahl der gebundenen Spermatozoen pro Eizelle nach Kapazitiering in TALPoC bzw. TALPmC. Die Spermatozoen, die ohne extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  kapazitierten, wurden für den Bindungstest gesplittet. Ein Aliquot wurde ohne den Zusatz von Kalzium mit den Eizellen inkubiert, bei der zweiten Gruppe lag während des Bindungstestes selbst  $\text{Ca}^{2+}$  in der Endkonzentration von 2 mM vor. Die Unterschiede in der Zahl gebundener Spermatozoen sind deutlich zu erkennen: nach Kapazitiering in TALPmC (erste Box) binden im Mittel  $34,5 \pm 4,6$  Spermatozoen, nach der Kapazitiering in TALPoC dagegen nur  $17,7 \pm 2,5$  Spermatozoen pro Eizelle (zweite Box). Dieser Unterschied ist signifikant ( $p < 0,005$ ). Die Zahl der gebundenen Spermatozoen nach Kapazitiering in TALPoC steigt signifikant auf  $47,2 \pm 1,1$  Spermatozoen pro Eizelle (dritte Box), wenn während des Bindungstests Kalzium vorliegt ( $p < 0,005$ ). Der Unterschied zwischen der Gruppe TALPmC und der Gruppe TALPoC+2mM  $\text{Ca}^{2+}$  ist nicht signifikant.

Diese Ergebnisse lassen zwei Schlußfolgerungen zu: ① die Bindung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen an arteigene Eizellen ist unabhängig von extrazellulärem Kalzium während der Kapazitiering *in vitro*, ② die Bindung der Spermatozoen an die Eizelle wird durch extrazelluläres Kalzium unterstützt.

Auffällig sind die Variationen in der Zahl gebundener Spermatozoen zwischen den einzelnen Eizellen: in allen drei Gruppen (TALPmC, TALPoC und TALPoC+2mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) liegen Eizellen außerhalb der 10 % Perzentile. Am größten ist die Varianz in der Zahl gebundener Spermatozoen in der Gruppe TALPoC: Minimum = 2 Spermatozoen/Eizelle, Maximum = 50 Spermatozoen/Eizelle. Ursache dieser Variationen ist vermutlich die unterschiedliche Bindungsaffinität der Eizellen. Da während der Bindungstests mindestens 4 Eizellen pro Spermatozoen-Testgruppe in der gleichen Platte inkubiert wurden, können Unterschiede in der Spermatozoenbehandlung als Ursache für diese Varianz ausgeschlossen werden.

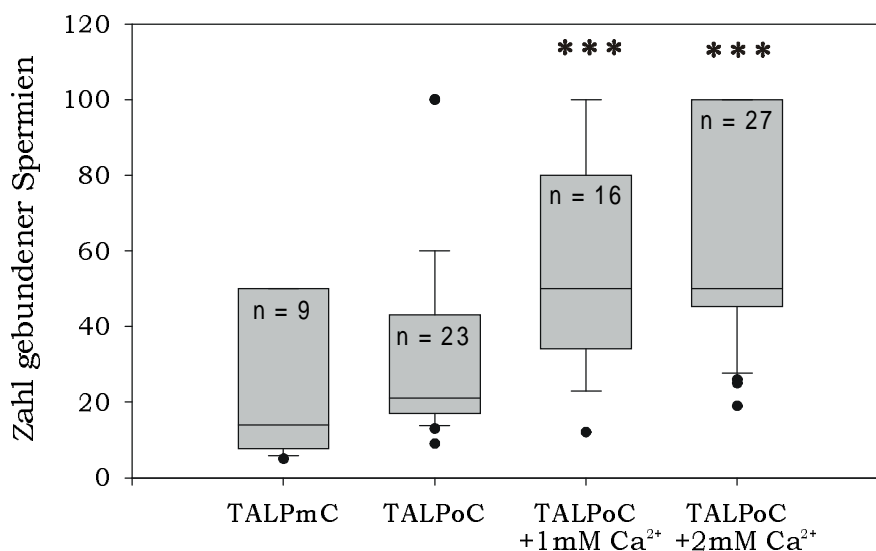
Tab. 6 zeigt exemplarisch für einen Versuchstag die Originaldaten, um die Varianz innerhalb der Gruppen zu veranschaulichen. Die Oocyten einer Testvariante wurden im gleichen Inkubationsgefäß mit dem gleichen Spermatozoenaliquot inkubiert.

**Tab. 6** Variation in der Zahl gebundener Spermatozoen pro Eizelle in den verschiedenen Kapazitieringmedien für Spermatozoen nach Vaginalspülung

Eizelle	Spermatozoen/Eizelle in den Testgruppen		
	TALPmC	TALPoC	TALPoC+2mM $\text{Ca}^{2+}$
1	50	21	39
2	17	15	50
3	18	11	50

4	45	8	46
<b>Mittelwert ± SEM</b>	<b>32,5 ± 8,7</b>	<b>13,8 ± 2,8</b>	<b>46,3 ± 2,6</b>

Im folgenden Test sollte überprüft werden, ob die Bindungsaffinität der Spermatozoen von *C. jacchus* von der Gewinnungsmethode beeinflusst wird. Die Abb. 37 zeigt die Bindungsaffinität für Spermatozoen, die durch PVS gewonnen wurden.



**Abb. 37** Bindungsfähigkeit von Spermatozoen nach PVS in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration.

Dargestellt ist die Anzahl Spermatozoen pro Eizelle (n = 9 bis 27) sowie der Median mit den 10%, 25%, 75%, 90% Perzentilen. Sig. Unterschiede durch \*\*\* gekennzeichnet.

Aufgrund der höheren Spermatozoendichte nach dieser Gewinnungsmethode konnte eine weitere Testgruppe untersucht werden, bei der während des Bindungstestes selbst Kalzium in der Endkonzentration von 1 mM vorlag.

Die Graphik zeigte deutliche Unterschiede in der Bindungsaffinität der Spermatozoen in Abhängigkeit vom Kapazitierungsmedium. Nach Kapazitierung in TALPmC waren im Mittel  $23,6 \pm 6,7$  Spermatozoen pro Eizelle bzw. in TALPoC im Mittel  $33,4 \pm 5,2$  Spermatozoen pro Eizelle detektierbar. Die Zahl gebundener Spermatozoen stieg signifikant nach Kapazitierung in TALPoC und dem Zusatz von Kalzium während der Bindung: mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  banden im Mittel  $55,4 \pm 7,4$  Spermatozoen pro Eizelle, dieser Anstieg ist im Vergleich zur Gruppe TALPoC signifikant ( $p < 0,005$ ). Auch in der Testgruppe mit 2 mM Kalzium während der Bindung ist die Anzahl der gebundenen Spermatozoen mit  $62,6 \pm 5,5$  pro Eizelle signifikant höher im Vergleich zur Gruppe TALPoC ( $p < 0,005$ ). In beiden Testgruppen ist auch der Anstieg im Vergleich zur Gruppe TALPmC signifikant höher (TALPoC + 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  vs. TALPmC  $p < 0,01$ ; TALPoC + 2mM  $\text{Ca}^{2+}$  vs. TALPmC  $p < 0,005$ ).

Der Vergleich der Graphiken in Abb. 36 und 37 zeigt, daß Unterschiede in der Zahl gebundener Spermatozoen in Abhängigkeit von der Gewinnungsmethode der Spermatozoen bestehen. Tab. 7 faßt diese Unterschiede zusammen.

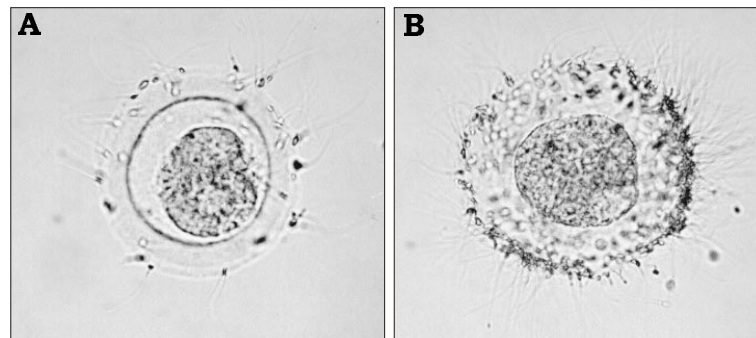
**Tab. 7** Vergleich der Mittelwerte Anzahl gebundener Spermatozoen pro Eizelle in den verschiedenen Medien für Spermatozoen nach Vaginalspülung und Vibrostimulation

Testgruppe	Zahl gebundener Spermatozoen pro Eizelle		
	Mittelwerte $\pm$ SEM		
	Vaginalspülung	Vibrostimulation	p
TALPmC	34,5 $\pm$ 4,6	23,6 $\pm$ 6,7	n.s.
TALPoC	17,7 $\pm$ 2,5	33,4 $\pm$ 5,2	p<0,05
TALPoC +2mM Ca <sup>2+</sup>	47,2 $\pm$ 1,1	62,6 $\pm$ 5,5	n.s.

Die Übersicht zeigt, ① die Zahl gebundener Spermatozoen nach Kapazitiering ohne Kalzium und ohne Kalziumzusatz während des Bindungstests (TALPoC) unterscheidet sich signifikant zwischen den beiden Gewinnungsmethoden (p<0,05) und ② die Verhältnisse im Vergleich der Gruppen TALPoC und TALPmC sind zwischen den beiden Gewinnungsmethoden verschieden. Während in der Gruppe nach VW mit der Kapazitiering in TALPmC eine Verdopplung der Zahl gebundener Spermatozoen im Vergleich zur Kapazitiering in TALPoC zu erkennen ist (17,7  $\pm$  2,5 vs. 34,5  $\pm$  4,6; p<0,005), besteht für diese beiden Medien kein Unterschied in der Zahl gebundener Spermatozoen in der Gruppe Vibrostimulation.

Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse der Bindungstests, daß ① die Bindung von Spermatozoen des Weißbüschelaffen nur an arteigene Eizellen erfolgt und daß ② nach einer Kapazitiering ohne extrazelluläres Kalzium eine höherer Anteil der Spermatozoen fähig ist, an salzgelagerte Eizellen zu binden. ③ Der signifikante Anstieg der Zahl gebundener Spermatozoen in den Testgruppen mit Kalzium während des Bindungsereignisses belegt, das Kalzium für eine erfolgreiche Bindung des Spermatozoons an die Eizelle obligat ist. ④ wird deutlich, das eine Kalziumkonzentration von 2 mM, die der physiologischen Konzentration *in vivo* entspricht, zu optimalen Bindungsergebnissen führt.

Die Fotos in Abb. 38 dienen der bildlichen Darstellung der oben beschriebenen Ergebnisse für Spermatozoen nach PVS. Links ist eine Eizelle nach dem Bindungstest mit Spermatozoen zu sehen, die in TALPoC kapazitiert wurden und auch während des Bindungstest selbst kein Kalzium vorlag. Das Foto rechts zeigt eine Eizelle mit Spermatozoen nach Kapazitiering in TALPoC und mit 2 mM Ca<sup>2+</sup> während der Inkubation zur Bindung.



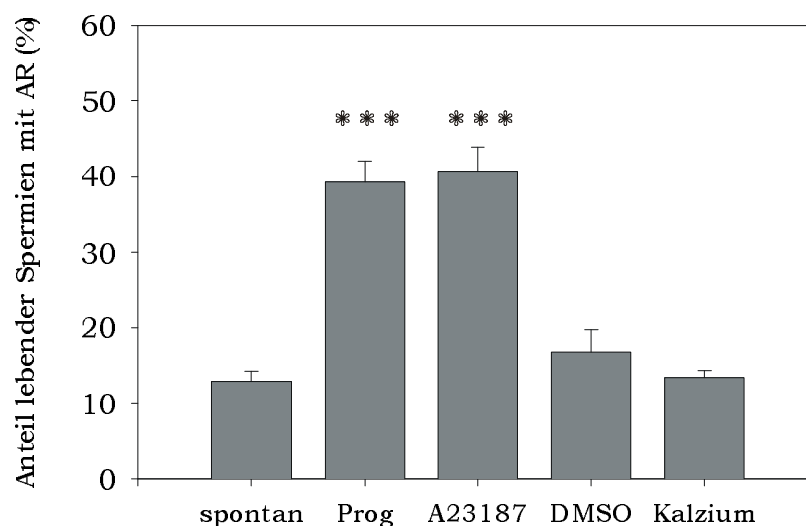
**Abb. 38** Eizellen nach Test's zur Bindungsfähigkeit von Spermatozoen nach PVS  
**links (A):** Kapazitierung und Bindung in TALPoC  
**rechts (B):** Kapazitierung in TALPoC; Bindung in TALPoC+2mM Ca<sup>2+</sup>.

### 3.6 Physiologische Induktion der Akrosomreaktion

Für die Charakterisierung der Rolle von extrazellulärem Kalzium im Verlauf der Befruchtungereignisse bei *C. jacchus in vitro* war die Akrosomreaktion ein entscheidender Parameter. Da die Inkubation mit A23187 keiner physiologischen Induktion der AR entspricht, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden, ob auch mit dem aus der Literatur bekannten physiologischen Induktor Progesteron nach einer Kapazitierung ohne extrazelluläres Kalzium die AR induzierbar ist.

#### 3.6.1 Induktion der Akrosomreaktion durch Progesteron

Zunächst wurde ein Induktionsexperiment konzipiert, in dem der Anteil lebender Spermatozoen mit AR nach der Inkubation mit Progesteron (12,5 µM) + 2 mM Ca<sup>2+</sup>, Ionophor (5 µM) + 2 mM Ca<sup>2+</sup>, DMSO (1:10 Vol%) und Ca<sup>2+</sup> (2 mM) bestimmt wurde.



**Abb. 39** Physiologische Induktion der AR durch Progesteron

Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der Anteile Spermatozoen mit spontaner bzw. ind. AR (n = 10). Sig. Anstieg im Vgl. zu spontaner AR durch \* gekennzeichnet.



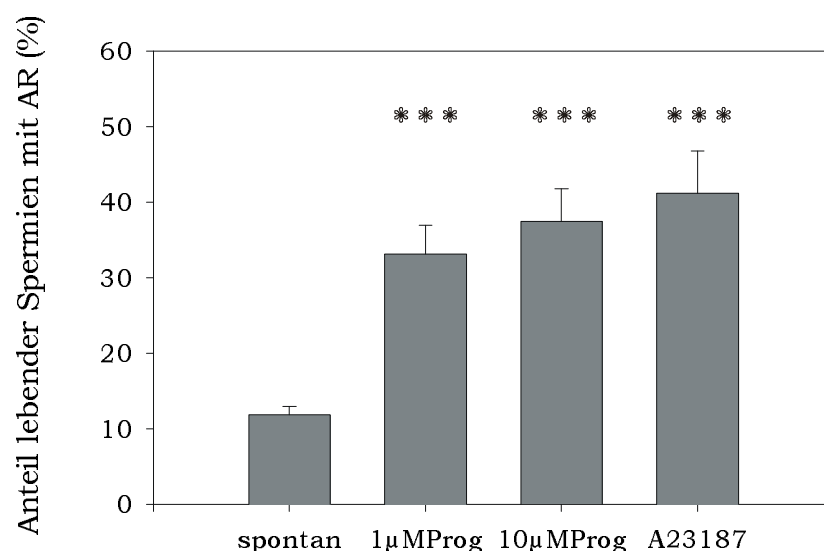
Der Graph in Abb. 39 zeigt die Ergebnisse für Spermatozoen gewonnen durch VW nach 2 h Kapazitiering in TALPoC. Während in der Kontrollgruppe  $12,9 \pm 1,3\%$  Spermatozoen spontane AR zeigten, reagierten auf die Inkubation mit Progesteron  $39,3 \pm 2,7\%$  Spermatozoen mit AR ( $p < 0,001$ ). Dieser signifikante Anstieg entspricht dem Anstieg nach der Induktion der AR mit A23187 ( $40,7 \pm 3,2\%$ ). Die Anteile lebender Spermatozoen mit AR in den beiden Kontrollen DMSO ( $16,8 \pm 3,0\%$ ) und  $2 \text{ mM Ca}^{2+}$  ( $13,4 \pm 0,9\%$ ) unterscheiden sich statistisch nicht vom Anteil Spermatozoen mit spontaner AR.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Spermatozoen des Weißbüschelaffen nach Kapazitiering *in vitro* ohne extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  auf den physiologischen Induktor Progesteron mit AR reagieren können. Voraussetzung für die AR ist auch hier die Präsenz von  $\text{Ca}^{2+}$  während der Induktion. Die Kontrollen DMSO und  $\text{Ca}^{2+}$  belegen, das weder Kalzium allein noch das Lösungsmittel für Progesteron DMSO eine physiologische AR induzieren können.

### 3.6.2 Dosis-Wirkung-Beziehung

In jüngerer Zeit wird die Existenz nicht-genomischer Steroidrezeptoren auf der Spermatozoenoberfläche verschiedener Spezies diskutiert (z.B. Mensch: Mendoza & Tesarik, 1993; Pferd: Cheng et al., 1998). Diese Rezeptoren werden vermutlich während der Kapazitiering exprimiert oder aktiviert (reviewed in Baldi et al., 1995).

In diesem Zusammenhang ergab sich für die vorliegende Arbeit die Frage, ob auch in den Spermatozoen von *C. jacchus* die unter 3.6.1 beschriebene Induktion der AR durch Progesteron ein rezeptorvermittelter Prozeß ist. Zur Beantwortung wurde die Dosis-Wirkung-Beziehung untersucht, da die Reaktion einer Zelle auf minimale Konzentrationen eines Wirkstoffes als Hinweis auf eine rezeptorgesteuerte Antwort gewertet werden kann.



**Abb. 40** Dosis-Wirkung-Beziehung für die Induktion der AR durch Progesteron  
Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der Anteile Spermatozoen mit spontaner bzw. ind. AR  
( $n = 10$ ). Sig. Anstieg im Vgl. zu spontaner AR durch \* gekennzeichnet.

Der Graph in Abb. 40 zeigt die Anteile lebender Spermatozoen mit AR (spontan bzw. induziert) nach der Inkubation mit 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Progesteron oder 5  $\mu\text{M}$  A23187. Die Darstellung zeigt deutlich, daß zwischen den Anteilen Spermatozoen mit induzierter AR keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Progesteron-Konzentration (Balken 2 und 3) bestehen. Auf die Induktion mit 1  $\mu\text{M}$  Progesteron reagieren  $33,1 \pm 3,9\%$  Spermatozoen mit AR, nach der Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Progesteron  $37,5 \pm 4,3\%$ . Der Unterschied ist nicht signifikant. Auch der Unterschied zur Kontrollgruppe, in der die Akrosomreaktion mit Ionophor A23187 induziert wurde ( $41,2 \pm 5,5\%$ ), ist in beiden Testgruppen nicht signifikant. Der Anstieg der akrosom-reagierten Spermatozoen nach Induktion mit Progesteron oder A23187 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit spontaner AR ( $11,9 \pm 1,2\%$ ) ist in allen drei Gruppen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

Die vergleichbare Induzierbarkeit der AR mit 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Progesteron lieferte erste Hinweise auf die Präsenz eines Rezeptors, der die Signale des Steroids in die Spermatozoenzelle vermittelt. Die Lokalisation des Rezeptors bleibt unklar, allerdings ist aufgrund der Reaktionsgeschwindigkeit (die Induktion der AR mit dem Steroid erfolgte innerhalb einer Inkubation mit dem Induktor für 10 min) ein membranständiger Rezeptor zu vermuten.

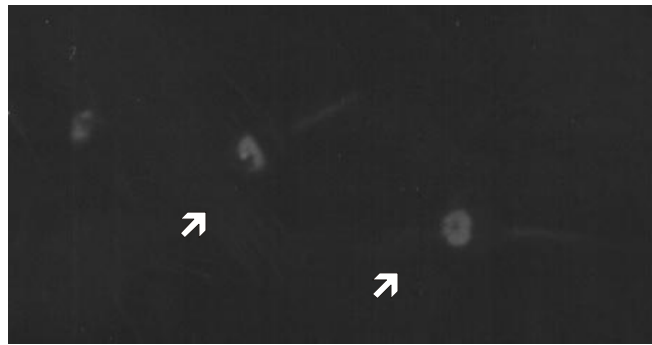
### 3.6.3 Rezeptornachweis

In einem weiteren Experiment sollte der Rezeptor lokalisiert und seine Expression in Abhängigkeit von der Kapazitierung der Weißbüschelaffen-Spermatozoen *in vitro* charakterisiert werden.

Als Vorlage diente hier ein für Pferdespermatozoen entwickeltes Protokoll (Cheng et al., 1998), daß nach zahlreichen Modifikationen folgende Ergebnisse lieferte:

- a) ohne vorherige Kapazitierung waren nach der Inkubation mit dem Progesteron-Antikörper (DIANOVA) keine Fluoreszenzsignale detektierbar.
- b) nach 2 h Kapazitierung in TALPmC bzw. TALPoC waren ohne Unterschiede in beiden Gruppen deutliche Fluoreszenzsignalen auf dem Spermatozoenkopf zu erkennen
- c) nach Kapazitierung und Induktion der AR waren keine Fluoreszenzsignale zu detektieren.

Die Abbildung 41 zeigt exemplarisch 2 FITC-markierte Spermatozoenkopfoberflächen. Diese Markierung erfolgt durch die Bindung des 2. unspezifischen und FITC-gelabelten Antikörpers an den ersten progesteron-spezifischen Antikörper.



**Abb. 41** Fluoreszenzsignale auf der Spermatozooberfläche nach Kapazitiering in TALPoC und Inkubation mit Progesteron-Antikörper (DIANOVA)

Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen daraufhin, daß es sich bei dem Progesteronrezeptor der Spermatozoen des Weißbüschelaffen um einen nicht-genomischen, membranständigen Steroidrezeptor handelt. Dieser Rezeptor ist erst nach Kapazitiering *in vitro* detektierbar, wird also erst während der Kapazitiering exprimiert oder aktiviert. Unwesentlich ist für diese Kapazitiering die Präsenz von extrazellulärem Kalzium, denn in beiden Medien (TALPoC und TALPmC) war das Signal gleichermaßen zu beobachten.

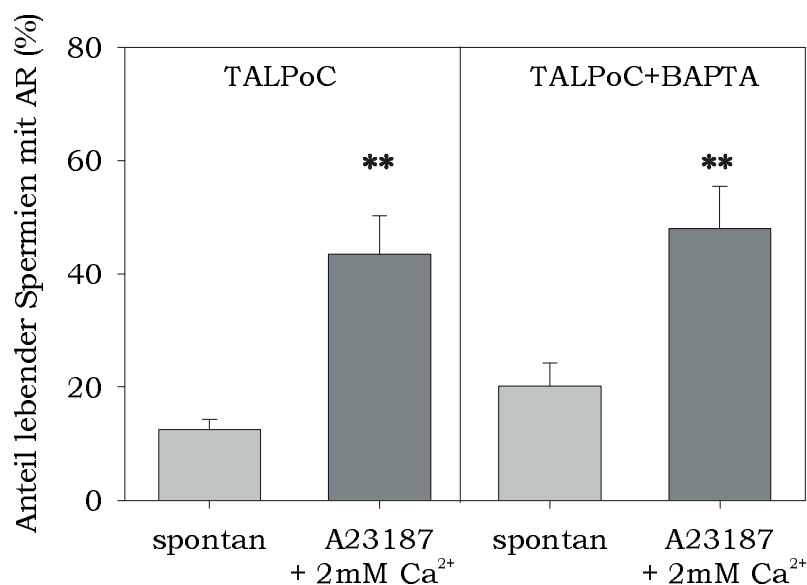
### 3.7 Einfluß von intrazellulärem Kalzium (Bindung mit BAPTA)

Eine zentrale Frage der bisher beschriebenen Untersuchungen war die Rolle von extrazellulärem Kalzium. Kalzium wird von einer Vielzahl von Zellen als *second messenger* Molekül genutzt, um verschiedenste Prozesse zu kontrollieren und zu regulieren (Berridge & Bootman, 1998). Parrish et al. (1999) konnten in einer Studie an Rinderspermatozoen zeigen, daß die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) direkt von der extrazellulären Präsenz des Kations im Medium beeinflusst wird. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Unabhängigkeit der Kapazitiering der Spermatozoen des Weißbüschelaffen *in vitro* von extrazellulärem Kalzium vermuten lassen, sollte in einer abschließenden Untersuchung der Einfluß der intrazellulären freien Kalziumkonzentration untersucht werden. Dafür wurde der Azetomethylester des Kalziumchelators BAPTA (Calbiochem) verwendet. Dieser Methylester ist membrangängig und wirkt somit intrazellulär. Durch die Bindung des freien intrazellulären Kalziums vor der Kapazitiering der Spermatozoen *in vitro* sollte die Rolle des Kations näher charakterisiert werden.

Spermatozoen gewonnen durch PVS wurden aufgereinigt, mit dem intrazellulären Kalziumchelator BAPTA beladen und 2 h in TALPoC inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde ohne BAPTA, also nur in TALPoC inkubiert. Nach der Kapazitiering wurde die AR mittels Ionophor A23187 in beiden Gruppen induziert.

Der Graph in Abb. 42 zeigt die Anteile lebender Spermatozoen mit spontaner bzw. induzierter AR nach Kapazitierung ohne (links) bzw. mit (rechts) BAPTA.

Die Darstellung zeigt deutlich, daß sowohl nach Kapazitierung ohne BAPTA als auch nach der Inkubation mit BAPTA ein deutlicher Anstieg der akrosom-reagierten Spermatozoen nach der Induktion mit dem Ionophor zu beobachten ist, wenn parallel mit dem Ionophor 2 mM Kalzium zugesetzt wird. In der Testgruppe mit BAPTA zeigen  $20,2\% \pm 4,1\%$  der Spermatozoen spontane AR nach 2 Kapazitierung *in vitro*. Durch die Inkubation mit A23187 und 2 mM extrazellulärem Kalzium erfolgt ein signifikanter Anstieg auf  $48,0\% \pm 7,4\%$  Spermatozoen mit AR ( $p < 0,01$ ). Der Unterschied zwischen der Testgruppe mit BAPTA und der Kontrollgruppe TALPoC ohne den Chelator ist nicht signifikant.



**Abb. 42** Induktion der AR nach Bindung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch BAPTA

Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der Anteile Spermatozoen mit spontaner bzw. induzierter AR ( $n = 6$ ). Signifikanter Anstieg im Vergleich zu spontaner AR durch \* gekennzeichnet.

Es bestehen also keine Unterschiede im Anteil der induziert akrosom-reagierten Spermatozoen zwischen Proben, die ohne extrazelluläres Kalzium (TALPoC) inkubiert wurden oder Proben, die mit gebundenem intrazellulärem Kalzium kapazitierten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß auch das freie intrazelluläre Kalzium keinen Einfluß auf die Kapazitierung der Spermatozoen von *Callithrix jacchus in vitro* hat.

## 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten umfangreiche Kenntnisse über die Physiologie der Spermatozoen des Neuweltaffen *Callithrix jacchus* gewonnen werden. Neben der Etablierung verschiedenster Methoden zur Charakterisierung der Spermatozoen können mittels der dargestellten Ergebnisse erstmals Aussagen über den Verlauf von Kapazitier- und Akrosomreaktion *in vitro* für einen Vertreter der Neuweltaffen gemacht werden. Diese ermöglichen einerseits einen Speziesvergleich und gleichzeitig vom evolutionären Standpunkt aus, für diese Art die Charakterisierung der in der Einleitung erwähnten Spezifikationen der geschlechtlichen Fortpflanzung. Durch die Betrachtung verschiedener Ereignisse der Kapazitier- und Fertilisierungskaskade innerhalb einer Spezies wird das Wissen über diese Prozesse entscheidend erweitert.

Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt wie gehabt in der Dreiteilung: grundlegende Methoden, Kapazitier- und Akrosomreaktion *in vitro* sowie Einfluß von Kalzium.

### Spermatozoensammlung, Präparation & Etablierung grundlegender Methoden

#### 4.1 Spermatozoensammlung

Zahlreiche Studien an *C. jacchus* zu Embryokultur (Lopata et al., 1988), IVF (Wilton et al., 1993), Oocytenreifung *in vitro* (Gilchrist et al., 1997) und Bindungsaffinität der Spermatozoen (Liu et al., 1991) verwendeten Proben, die durch den invasiven Eingriff der Kastration bzw. mittels Elektroejakulation gewonnen wurden. Nachteile dieser Gewinnungsmethoden sind neben der Invasivität auch die nur eingeschränkte Wiederholbarkeit der Spermatozoengewinnung und die erforderliche Sedation der Tiere. Eine Studie zur Elektroejakulation bei *C. jacchus* diskutiert die Gewinnungsmethode selbst auch als mögliche Ursache für einen relativ hohen Anteil von Spermatozoen (50 %) mit Schwanzdefekten (Cui et al., 1991). Aus diesen Gründen kann die Etablierung der Gewinnung von Spermatozoen mittels der Methode der Vaginalspülung (Küderling et al., 1996) wohl als großer Vorteil für jede Untersuchung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen verstanden werden (Morrell et al., 1996). Diese Methode wurde deshalb auch in der vorliegenden Arbeit als primäres Verfahren zur Gewinnung von Spermatozoen eingesetzt. Die Erfolgsquote der Verpaarungen lag im Bezug auf die erfolgten Kopulationen mit 77,1 % und im Bezug auf tatsächlich gewonnene Ejakulate mit 61,6 % deutlich höher als in der etablierenden Arbeit (Kopulationen: 57,7 %; Ejakulate: 44,9 %) von Küderling et al. (1996). Gründe dafür liegen in der Vorauswahl geeigneter Tiere in der vorliegenden Arbeit, aber auch in der deutlich höheren Zahl erfolgreicher Verpaarungen ( $n = 319$  vs.  $n = 156$ ). Die Abb. 14 zeigt deutlich, daß die inter- und auch intraindividuelle Varianz der Erfolgsquote der Verpaarungen relativ hoch ist, so daß die Vorauswahl der Tiere diese Erfolgsquote entscheidend beeinflussen kann. Auch wurden in der vorliegenden Arbeit die Paarungspartner entsprechend der Kompatibilität ausgetauscht, was selbstverständlich in der etablierenden Arbeit (Küderling et al., 1996) nicht möglich war, da hier unter anderem der Einfluß der einzelnen Individuen untersucht werden sollte.

Die Dichte der Spermatozoen in der Spüllösung variierte in der vorliegenden Arbeit zwischen 1,0 und  $512 \cdot 10^6/\text{ml}$ , wobei der Mittelwert bei  $88,9 \cdot 10^6/\text{ml}$  lag und damit dem Mittelwert der zitierten Arbeit ( $67 \cdot 10^6/\text{ml}$ ) entspricht. Die breite Spanne der Mittelwerte und Mediane der einzelnen Tiere ( $32,4 \cdot 10^6/\text{ml}$  bis  $225,5 \cdot 10^6/\text{ml}$ ; vgl. Abb. 15) verdeutlicht die interindividuelle Varianz im Bezug auf die Spermatozoendichte, die auch in früheren Arbeiten gezeigt wurde (Morrell et al., 1996). Marson et al. (1988) konnten für Schimpanzen zeigen, daß hier große Unterschiede in der Dichte zwischen den Individuen bestehen (45 bis 903 Mio/ml). Retrospektive Studien an fertilen Männern zeigen, daß auch in humanen Ejakulate signifikante Unterschiede in der Spermatozoendichte sowohl innerhalb als auch zwischen den Individuen auftreten (Mallidis et al., 1991).

Die Erklärung der Varianz der Spermatozoendichte beim Weißbüschelaffen fällt allerdings relativ schwer. Als eine mögliche Ursache wurde die Dauer der Trennung des Männchens von einer Paarungspartnerin getestet. Die schwach positive jedoch hoch signifikante Korrelation ( $r = 0,33$ ;  $p < 0,005$ ) läßt einen schwachen Einfluß der Trennungsdauer vermuten, wobei Küderling et al. (1996) keinen Einfluß auf die Spermatozoendichte in der Spüllösung nachweisen konnten. Als Ursache für die unterschiedlichen Befunde kann auch hier die wesentlich höhere Stichprobenzahl der vorliegenden Arbeit betrachtet werden. Ein weiterer Grund könnten die unterschiedlichen Größen der betrachteten Zeitintervalle sein (0-340 h vs. 0-6 Tage). Um die unterschiedlichen Befunde aufzuklären, wurde der Einfluß der Trennungsdauer auf die Spermatozoendichte wie in der Arbeit von Küderling et al. (1996) in Tagen im Kruskal-Wallis-Test überprüft. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten deutlich, daß ein hoch signifikanter Einfluß besteht ( $p < 0,005$ ). Der paarweise Vergleich zeigte, daß am Tag 3 ( $p < 0,01$ ) und am Tag 4 ( $p < 0,05$ ) ein signifikanter Anstieg der Spermatozoendichte im Vergleich zu Tag 1 erfolgte. Das heißt, der signifikante Einfluß der Trennungsdauer auf die Dichte bleibt erhalten, wenn die Auswertung entsprechend der Arbeit von Küderling et al. (1996) erfolgt. Die Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Untersuchungen liegt demzufolge wohl in der wesentlich höheren Stichprobenzahl der vorliegenden Arbeit begründet.

Eine weitere Ursache der Varianz der Spermatozoendichte könnten auch Unterschiede in der Wiedergewinnungsrate der Spermatozoen aus dem weiblichen Genitaltrakt sein.

Die Daten dieser Untersuchung zeigen auch, daß die Trennungsdauer auf die einzelnen Individuen in unterschiedlichem Ausmaß Einfluß hat. Dies könnte ein Grund für die bereits oben angesprochene große Varianz der Spermatozoendichte zwischen den Individuen sein. Während für einige Tiere eine signifikante Korrelation zwischen Trennungsdauer und Spermatozoendichte besteht, gilt diese für andere Tiere nicht (vgl. Abb. 17). Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß es sich bei der Spermatogenese um einen Vorgang handelt, der von den verschiedensten Faktoren beeinflusst wird. Cui (1996) konnten beispielsweise zeigen, daß Streß die Spermatozoendichte bei *Callithrix jacchus* hochsignifikant beeinflusst. Da das Ziel der vorliegenden Arbeit jedoch nicht die Untersuchung der die Spermatozoendichte beeinflussenden Faktoren war, soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden.

## 4.2 Vergleich *swim up* und Percoll-Zentrifugation

In der Andrologie werden verschiedene Methoden zur Reinigung und Anreicherung von Spermatozoen eingesetzt. Die zwei Techniken *swim up* und Dichtegradientenzentrifugation wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet und daher im Vorfeld hinsichtlich ihres Einflusses auf einige wichtige Spermatozoenparameter verglichen. Die Ergebnisse dieses Vergleiches (siehe Abb. 19) zeigen deutlich, daß zwischen *swim up* und Percoll-Zentrifugation keine signifikanten Unterschiede im Anteil lebender Spermatozoen (84,8 % vs. 81,8 %) bzw. im Anteil lebender akrosom-reagierter Spermatozoen (spontan: 12,2 % vs. 12,1 %; induziert: 38,8 % vs. 45,1 %) bestehen. Dies entspricht den Befunden früheren Arbeiten, die beispielsweise für humane Spermatozoen keinen Unterschied der Befruchtungsrate nach Aufreinigung durch *swim up* bzw. Percoll feststellen konnten (Tanphaichitr et al., 1988). Vandervoort et al. (1994) konnten im Vergleich von Percoll-Zentrifugation und *swim up* für Spermatozoen von *Macaca fascicularis* zeigen, daß weder der Anteil der lebenden Spermatozoen mit AR noch der Anteil der an die *Zona pellucida* gebundenen Spermatozoen durch die Technik der Aufreinigung beeinflußt wird. All diese Daten beweisen, daß die Aufreinigungsmethode keinen signifikanten Einfluß auf die Physiologie oder Funktion von Spermatozoen hat. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit beide Methoden gleichermaßen in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Spermatozoenprobe eingesetzt; vor allem für die Proben gewonnen durch PVS wurde die Percoll-Zentrifugation verwendet, um die Spermatozoen vom sehr dichten und voluminösen Seminalplasma trennen zu können.

## 4.3 Detektion toter Spermatozoen

Die Bestimmung des Anteils lebender Spermatozoen ist ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Spermatozoenphysiologie und zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Spermatozoenfunktionen. In der andrologischen Forschung wurden die verschiedensten Methoden etabliert, wobei in der Eignung dieser für bestimmte Spezies artspezifische Unterschiede festgestellt werden konnten (Pintado et al., 2000). Daher wurden im Etablierungsabschnitt der vorliegenden Arbeit zwei Fluoreszenzfärbetechniken und der *swelling*-Test zur Detektion toter Spermatozoen beim Weißbüschelaffen etabliert und miteinander verglichen. Der Vergleich der drei Methoden erfolgte in der *repeated measures* ANOVA nach Friedman. Dieser Test zeigte, daß zwischen den 3 Methoden kein signifikanter Unterschied im Anteil tot-markierter Spermatozoen besteht ( $p > 0,05$ ). Auch der paarweise Vergleich der drei Methoden im Man-Whitney U-Test bestätigte dieses Ergebnis (Propidiumjodid vs. *swelling*-Test:  $p > 0,05$ ; . Propidiumjodid vs. Hoechst 33258:  $p > 0,05$ ; Hoechst 33258 vs. *swelling*-Test:  $p > 0,05$ ).

Die schwache Verlagerung der Korrelationsgeraden Propidiumjodid vs. *swelling*-Test (Abb. 20 links) nach links vom Achsenursprung macht deutlich, daß mittels des *swelling*-Tests ein geringfügig höherer Anteil Spermatozoen als tot detektiert wird. Die Berechnung der Geradengleichung ergibt den Faktor 1,1. Auch Jeyendran et al. (1984) zeigten eine positive Korrelation zwischen dem Anteil markierter Spermatozoen mittels *swelling*-Test und mittels des Vitalfarbstoffes Eosin Y.

Der zweite Test diente dem Vergleich der zwei Fluoreszenzmarkierungen mit Propidiumjodid bzw. Hoechst 33258. Beide Farbstoffe binden an die DNA toter Zellen. Auch die Detektion toter Spermatozoen mittels dieser beiden Methoden korreliert hoch signifikant ( $r = 0,9$ ;  $p < 0,005$ ). Die Betrachtung der Einzeldaten zeigt, daß der Anteil propidiumpositiver Spermatozoen etwas höher liegt. Der Faktor der berechneten Geradengleichung beträgt 1,2. Dies entspricht den Ergebnissen des Vergleichs dieser Methoden für Bullenspermatozoen, der einen Faktor von 1,013 ermittelte (Pintado et al., 2000). Centola et al. (1990) konnten dagegen für humane Spermatozoen keine Unterschiede in den Anteilen tot-markierter Spermatozoen zwischen den beiden Methoden zeigen. Als Ursachen kommen die unterschiedlichen Konzentrationen der Farbstoffe und/oder Speziesunterschiede in Frage.

Die Arbeit von Pintado et al. (2000) zeigt, daß der Anteil propidiumjodid-positiver Spermatozoen im Vergleich zur Eosinmarkierung ebenfalls höher liegt, Propidiumjodid also stets einen höheren Anteil Spermatozoen als tot detektiert. Ursachen könnten eine toxische Wirkung des Farbstoffes oder eine höhere Bindungsaffinität von Propidiumjodid sein.

Die gezeigten Vergleiche machen deutlich, daß alle 3 untersuchten Methoden einsetzbar sind und verlässliche Daten liefern. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, daß bei der Interpretation der Daten stets auch die benutzte Methode berücksichtigt werden muß, vor allem dann, wenn die Ergebnisse verschiedener Studien verglichen werden sollen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Detektion toter Spermatozoen auf Grund seiner Praktikabilität der Farbstoff Hoechst 33258 eingesetzt. Ein weiterer Grund war die ideale Kombinationsmöglichkeit dieser Färbung mit der für Makakenspermatozoen bereits etablierten Markierung des Akrosoms durch das FITC-markierte *Pisum sativum*-Lektin (Cross et al., 1989).



### **Kapazitierung und Akrosomreaktion *in vitro***

Nachdem die grundlegenden Methoden für Spermatozoensammlung, Aufbereitung und auch Markierung etabliert und validiert waren, sollte im folgenden Abschnitt der Prozeß der Kapazitierung charakterisiert werden. Dazu wurde der Zeitverlauf der Kapazitierung *in vitro* anhand der spontanen sowie der induzierten Akrosomreaktion bestimmt und der Einfluß der Kapazitierungsförderer Heparin und cAMP untersucht.

#### **4.4 Zeitverlauf**

Zahlreiche Studien zeigen, daß die Inkubationszeit einen entscheidenden Einfluß auf die Kapazitierung *in vitro* hat. Diese Charakterisierung erfolgt dabei entweder durch die Detektion der unterschiedlichen Stadien, die die Spermatozoen während der Kapazitierung durchlaufen mittels Chlortetrazyklin (Lee et al., 1987) oder durch die Bestimmung des Anteils lebender Spermatozoen mit spontaner und/oder induzierter Akrosomreaktion (Perry et al., 1995).

##### Spontane Akrosomreaktion

In der vorliegenden Arbeit wurde der zeitliche Verlauf der Kapazitierung *in vitro* zunächst mittels der spontanen AR beurteilt. Die Graphik in Abbildung 21 zeigt deutlich, daß erst nach einer Inkubation von 7 bis 8 h ein signifikanter Anstieg der Anzahl Spermatozoen mit spontaner AR zu beobachten ist. Während der Anteil in den ersten Intervallen 0-1 h, 2-3 h und 4-6 h konstant zwischen  $7,9 \pm 1,1$  % und  $9,9 \pm 1,8$  % lag, erfolgte nach 7-8 h im Vergleich zum ersten Intervall ein signifikanter Anstieg auf  $13,1 \pm 1,0$  % ( $p < 0,05$ ). Dieser Verlauf entspricht den Ergebnissen verschiedener Studien humaner Spermatozoen. So zeigten u.a. Talbot & Chacon (1981) für humane Spermatozoen einen Anstieg des Anteils der Spermatozoen mit spontaner AR von 12 % im Intervall 0 h bis zu 28 % nach 8 h Inkubation und auch Amin et al. (1996) konnten einen Anstieg von  $< 10$  % humanen Spermatozoen mit spontaner AR im Intervall 0-1 h auf 12-18 % nach 3 h Inkubation nachweisen. Auch für Spermatozoen nicht-menschlicher Primaten liegen erste Versuche vor, den Verlauf der Kapazitierung *in vitro* zu charakterisieren, die jedoch einen anderen Verlauf für diese Spezies erkennen lassen. Kholkute et al. (1990) zeigten für Spermatozoen des Neuweltaffen *Saimiri sciureus* mittels der Detektion durch CTC, daß der Anteil der Spermatozoen mit spontaner AR während einer Inkubation über 8 h konstant bei ca. 15 % liegt. Für Hundespermatozoen dagegen konnten Kawakami et al. (1993) zeigen, daß der Anteil spontan-akrosomreagierender Spermatozoen während einer Inkubation von 7 h von  $< 5$  % zum Zeitpunkt 0 h auf 31,3 % nach 7 h ansteigt. Auch für Mausspermatozoen konnte ein Anstieg der Spermatozoen mit spontaner AR von 22 % nach 90 min auf 40 % nach 210 min beobachtet werden (Ward & Storey, 1984). Für Ziegenspermatozoen zeigten Kaul et al. (1997) ebenfalls einen Anstieg des Anteils der Spermatozoen mit spontaner AR von 15 % nach 0 h auf 50 % nach 8 h Inkubation unter Kapazitierungsbedingungen in Medium mit 2 mmol/l Kalzium. Diese Befunde unterstreichen erneut die bereits erwähnten spezies-spezifischen Unterschiede in Kapazitierung und AR.

### Induzierte Akrosomreaktion

Mehr Aufschluß über den Verlauf der Kapazitierung *in vitro* gibt die Betrachtung der Induzierbarkeit der AR. Während bei der Betrachtung der Abb. 22 der Anteil Spermatozoen mit spontaner Akrosomreaktion nach 2 h Inkubation keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 0 h Inkubation erkennen läßt (11,2 % vs. 10,7 %), erfolgt im Anteil Spermatozoen mit induzierter AR ein signifikanter Anstieg von  $25,0 \pm 2,9$  % nach 0 h auf  $35,7 \pm 2,5$  % ( $p < 0,05$ ) nach 2 h Inkubation unter Kapazitierungsbedingungen in TALPmC. Dieser signifikante Anstieg beweist, daß bereits nach einer Kapazitierung von 2 h 10 % mehr Spermatozoen befruchtungsfähig sind. In Proben humaner Spermatozoen liegt der Anteil Spermatozoen mit induzierter AR nach 3 h Inkubation mit  $31,3 \pm 4,5$  % in vergleichbarer Höhe (Lee et al., 1987). Perry et al. (1995) konnten für humane Spermatozoen allerdings erst nach 6 h Inkubation einen signifikanten Anstieg des Anteils Spermatozoen mit induzierter AR nachweisen. Ursache für diese unterschiedlichen Befunde sind vermutlich die verschiedenen verwendeten Methoden; während die Arbeit von Lee et al. (1987) den CTC-Assay benutzt, wurde in der Studie von Perry et al. (1995) die indirekte Fluoreszenzmarkierung des Akrosoms mit einem monoklonalen Hamster Anti-Maus Antikörper verwendet. Diese Techniken unterschieden sich entscheidend in den zugrundeliegenden Prinzipien, so daß dies zu diesen unterschiedlichen Befunden führt.

Entscheidendes Ergebnis der Untersuchung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen ist der Nachweis eines Kapazitierungseffektes nach wesentlich kürzerer Zeit durch die Betrachtung der Induzierbarkeit der AR, der mittels der spontanen AR so nicht zu erkennen war. Auch für Spermatozoen anderer nicht-menschlicher Primaten konnte ein Effekt der Kapazitierung in vergleichbaren Zeitintervallen nachgewiesen werden. So reagieren 60 % der Spermatozoen von *Saimiri sciureus* nach 2 h Inkubation mit AR auf die Induktion durch das Ionophor A23187 (Kholkute et al., 1990) und auch 56,3 % der Spermatozoen von *Macaca fascicularis* zeigten induzierte AR nach 2,5 h Inkubation und 30 min Aktivierung (Vandevoort & Overstreet, 1996).

Auffällig ist der relativ hohe Anteil Spermatozoen mit induzierter AR in den Proben ohne Inkubation, also zum Zeitpunkt 0. Hierfür gibt es zwei Erklärungen: erstens die Methode der Spermatozoengewinnung und zweitens die Zeitverzögerung durch die Aufreinigung der Spermatozoen. In diesem Teil der Studie wurden Spermatozoen eingesetzt, die durch die Methode der Vaginalspülung gewonnen wurden. Damit ist ein kapazitierungs-stimulierender Effekt der weiblichen Sekrete nicht auszuschließen. Zusätzlich zu dieser Stimulation ab dem Zeitpunkt der Ejakulation ergab sich durch den Spülvorgang, den Transport der Probe ins Labor und die Aufreinigung der Spermatozoen eine Zeitverzögerung von bis zu 60 min, in der kapazitierungs-assoziierte Reifungsprozesse ablaufen konnten. Die Fluoreszenzmarkierung des Akrosoms in der ursprünglichen Probe ohne Aufreinigung war jedoch nicht möglich, da Bestandteile des Seminalplasmas und/oder der weiblichen Sekrete zu massiven Hintergrundfärbungen führten. Somit konnte auf die Aufreinigungsschritte nicht verzichtet werden und eine Aussage über die Induzierbarkeit der AR in Proben ohne Kapazitierung *in*

*vitro* ist mit den derzeit für die Spermatozoen des Weißbüschelaffen etablierten Methoden nicht möglich.

Durch den Einsatz besonders gut zu handhabender Tiere konnte die zeitliche Verzögerung auf ca. 30 min reduziert werden. Den Zeitverlauf der Induzierbarkeit der AR zeigt exemplarisch für ein Tier der rechte Teil der Graphik in Abb. 23. Hier ist deutlich zu erkennen, daß zwischen dem Anteil Spermatozoen mit spontaner AR (linke Seite, erster Balken) und dem Anteil Spermatozoen mit induzierter AR (rechte Seite, erster Balken) kein signifikanter Unterschied besteht (10,5 % vs. 10,0 %). Ohne eine Inkubation unter kapazitierungsfördernden Bedingungen ist also keine Zunahme der AR nach Induktion mit dem Ionophor A23187 möglich. Dies beweist grundlegend die Existenz von Reifungsprozessen zur Erlangung der Befruchtungsfähigkeit für die Spermatozoen von *Callithrix jacchus*.

Die Ergebnisse der Untersuchungen in diesem Abschnitt zeigen, daß bereits eine Inkubation von 2 h ausreichend ist, um Effekte der Kapazitierung *in vitro* in Spermatozoen des Weißbüschelaffen zu untersuchen. Dieses Zeitintervall wurde daher für alle folgenden Untersuchungen verwendet.

#### **4.5 Einfluß von Kapazitierungsförderern**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind für verschiedene untersuchte Spezies Substanzen bekannt, die die Kapazitierung der Spermatozoen *in vitro* unterstützen. Der Einfluß von zwei der wichtigsten Moleküle, Heparin und cAMP auf die Spermatozoen des Weißbüschelaffen wurde in dieser Arbeit untersucht.

##### Heparin

Der unterstützende Effekt des Glykosaminoglykans auf die Kapazitierung und die Befruchtungsfähigkeit von Spermatozoen *in vitro* ist unter anderem für Bullen (Chian & Sirard, 1995), Hunde (Kawakami et al., 1999), Ziegen (Palomo et al., 1995) und auch für die Spermatozoen der Oryx-Antilope (Roth et al., 1998) bekannt. Außerdem konnten Handrow et al. (1984) spezifische Bindungsstellen für Heparin auf der Oberfläche der Spermatozoen von Bulle, Hase und Rhesusaffe nachweisen. Über den kapazitierungsfördernden Effekt des Glykosaminoglykans in Primatenspermatozoen lagen bisher jedoch noch keine Erkenntnisse vor.

Die hier dokumentierten Ergebnisse der Untersuchung an den Spermatozoen des Weißbüschelaffen zeigen deutlich, daß der Anteil der Spermatozoen mit induzierter AR nicht von der Inkubation mit Heparin beeinflusst wird (vgl. Abb. 24). Zwar erfolgt ein signifikanter Anstieg des Anteils Spermatozoen mit AR nach der Inkubation mit Heparin, doch auch in der Kontrollgruppe ohne Heparin ist dieser Anstieg zu beobachten. Das heißt, der Anstieg ist auf den kapazitierenden Effekt der Inkubationszeit, nicht aber auf die Inkubation mit Heparin zurückzuführen. Vergleichbare Ergebnisse zeigte eine Untersuchung an Hengstpermatozoen (Parker et al., 2000), die durch die Inkubation der Spermatozoen mit Heparin keine Veränderungen in der CTC-Fluoreszenz feststellen konnten. Auch für Hamsterspermatozoen konnte kein unterstützender Effekt des Glykosaminoglykans auf die Kapazitierung

nachgewiesen werden (Handrow et al., 1986). Diese Ergebnisse sind ein zusätzlicher Hinweis auf die bereits erwähnten spezies-spezifischen Unterschiede in den Reifungsprozessen der Spermatozoen. Da verschiedenste Prozesse der Kapazitierung unter dem Einfluß von Heparin zu stehen scheinen, ergeben sich mehrere Erklärungsansätze für diese Unterschiede. Für Bullenspermatozoen konnte bewiesen werden, daß die Inkubation mit Heparin die gleichen Effekte hat wie die Inkubation mit Eileiterflüssigkeit (Parrish et al., 1989). Weiterführend konnten Mahmoud & Parrish (1996) für Bullenspermatozoen zeigen, daß die Oberflächenänderungen, die während der Kapazitierung stattfinden, gleichermaßen durch Heparin und durch Ovidukt-Flüssigkeit induziert werden. Dies könnten den fehlenden Effekt von Heparin auf die Spermatozoen des Weißbüschelaffen erklären. Da die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit durch Vaginalspülung gewonnenen Spermatozoen durchgeführt wurden und somit die Oberflächenänderungen durch den Kontakt zu den weiblichen Sekreten bereits induziert sein könnten, kann ein induzierender Effekt durch Heparin nicht mehr nachgewiesen werden. Andererseits umfaßte der Aufenthalt der Spermatozoen im unteren Abschnitt des weiblichen Genitaltraktes stets einen Zeitraum von weniger als 2-3 min, so daß ein Kontakt zur Eileiterflüssigkeit eher unwahrscheinlich ist. Um also die Frage zu klären, warum Heparin keinen Einfluß auf die Kapazitierung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen hat, müssen die durch Heparin beeinflussten Prozesse näher betrachtet werden. Die Inkubation mit Heparin führt zu multiplen Aktivierungsprozessen, u.a. zum Anstieg des cAMP-Spiegels (Parrish et al., 1994) und zur Stimulation der Proteinphosphorylierung (Galantino-Homer et al., 1997). Die Mechanismen, über die der cAMP-Anstieg stimuliert wird, sind nicht aufgeklärt. Diskutiert werden die Wege über die Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes (Parrish et al., 1994) oder aber über Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Cordoba et al., 1997) vermutlich durch die Hemmung der Bindung von Calmodulin an die akrosomale Membran (Leclerc & Goupil, 2000). Calmodulin, ein Regulatorprotein der Aktivität verschiedener Enzyme, bindet Kalzium, wird dadurch von einer inaktiven in die aktive Form transformiert und bindet dann an Enzyme und Zellproteine. Die stimulierende Wirkung von Heparin u.a. durch die Hemmung der Bindung von Calmodulin an die Membran und die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ist entscheidend für die Spezies, in denen die Akkumulation von Kalzium in der Zelle während der Kapazitierung nachgewiesen ist (Parrish et al., 1999). Z.B. für Rinderspermatozoen wäre damit auch der kapazitierungs-fördernde Effekt von Heparin zu erklären: Heparin stimuliert den Einstrom von Kalzium (Cordoba et al., 1997), die erhöhte Kalziumkonzentration führt zur Zunahme des cAMP-Spiegels, durch diesen wiederum werden verschiedene Reifungsprozesse getriggert (siehe Einleitung). In Zellen, deren Kalziumspiegel sich im Verlauf der Kapazitierung nicht verändert oder aber die Aktivierung von cAMP durch andere Prozesse gesteuert wird, könnte dann auch keine Stimulation durch Heparin erfolgen. Um die Frage nach der fehlenden Wirkung von Heparin auf die Spermatozoen von *Callithrix jacchus in vitro* zu beantworten, muß daher die Rolle von Kalzium genauer betrachtet werden.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird Heparin in Studien zur Kapazitierung *in vitro* eingesetzt, da es den in den Sekreten des weiblichen Genitaltraktes gefundenen

Glykosaminoglykanen entspricht. Eine kapazitierungs-fördernde Wirkung von Heparin *in vitro* könnte somit auf eine kapazitierungs-stimulierende Wirkung dieser Glykosaminoglykane *in vivo* hinweisen. Möglicherweise erfolgt jedoch bei *Callithrix jacchus* eine „spontane“ Kapazitierung, da das Paarungssystem der Weißbüschelaffen keine Induktion erforderlich macht, so daß dieser induktive Effekt der Glykosaminoglykane unnötig wäre.

### cAMP und Coffein

Das *second messenger* Molekül cAMP fördert die Kapazitierung von Spermatozoen verschiedener Spezies *in vitro* (z.B. Rhesusaffe: Boatman & Bavister, 1984; Maus: Visconti et al., 1995a). Auch auf die Spermatozoen des Weißbüschelaffen konnte ein kapazitierungs-unterstützender Effekt nachgewiesen werden. Die Betrachtung der Graphik in Abb. 25 zeigt, daß die Inkubation mit 1 mM dbcAMP und 1 mM Coffein zur Steigerung des Anteils akrosom-reagierter Spermatozoen um 20 % im Vergleich zur Kontrollgruppe führt ( $42,6 \pm 5,6$  % vs.  $62,8 \pm 3,4$  %;  $p < 0,01$ ). Der Anteil der Spermatozoen mit spontaner AR blieb dagegen von der Inkubation unbeeinflusst. Dieser Anstieg der induzierten AR beweist eine kapazitierungs-fördernde Wirkung der Inkubation mit dbcAMP und Coffein auf die Spermatozoen von *Callithrix jacchus*. Dieser Effekt konnte für verschiedene Makakenspezies bereits bewiesen werden. So führt die Inkubation der Spermatozoen von *Macaca fascicularis* mit dbcAMP und Coffein zu einem Anteil von  $56,3 \pm 5,2$  % Spermatozoen mit AR nach der Induktion mit dem Ionophor A23187 (Vandevoort & Overstreet, 1996) und zu einer enormen Steigerung ( $14,5 \pm 3,7$  % vs.  $95,7 \pm 16,1$  %) des Anteils der an die *Zona pellucida* gebundenen Spermatozoen sowie zu einer Verdopplung ( $7,4 \pm 3,3$  % vs.  $15,8 \pm 1,4$  %) der gebundenen akrosom-reagierten Spermatozoen (Vandevoort et al., 1994). Aus dieser Beobachtung schlußfolgern Tollner et al. (1995), daß die Inkubation mit dbcAMP und Coffein die Kapazitierung Makakenspermatozoen *in vitro* reguliert. Für Spermatozoen von *Macaca mulatta* konnten Boatman und Bavister (1984) zeigen, daß nur dbcAMP-aktivierete Spermatozoen in der Lage sind, Eizellen zu penetrieren (Kontrolle: 0 % vs. Aktivierung: 57 % penetrierte Eizellen).

Trotz der vergleichbaren Effekte der Aktivatoren auf die Induzierbarkeit der AR durch das Ionophor A23187 (*C. jacchus*:  $62,8 \pm 3,4$  %; *M. fascicularis*:  $56,3 \pm 5,2$  %) muß hervorgehoben werden, daß deutliche Unterschiede zwischen den Spermatozoen des Weißbüschelaffen und denen der untersuchten Makakenarten bestehen. Während Makakenspermatozoen ohne Aktivierung nicht in der Lage sind, Eizellen zu penetrieren, konnte in  $42,6 \pm 5,6$  % der Spermatozoen des Weißbüschelaffen auch ohne Inkubation mit dbcAMP und Coffein die Induktion der AR durch A23187 beobachtet werden. Während die Aktivatoren für die Kapazitierung der Makakenspermatozoen also unerläßliche Voraussetzung sind, führen sie bei den Spermatozoen des Weißbüschelaffen nur zu einer Steigerung verschiedener Reifungsprozesse. Diese Spermatozoen unterliegen also einer kapazitierungs-fördernden, aber nicht einer kapazitierungs-induzierenden Wirkung von dbcAMP und Coffein. Diese Beobachtung erklärt auch die fehlende Stimulation der Kapazitierung durch Heparin (siehe oben).

Die Prozesse, durch die Stimulation (oder Induktion) der Kapazitierung durch dbcAMP und Coffein in der Spermatozoenzelle vermittelt wird, sind weitgehend ungeklärt. Allgemein führt die Inkubation mit dbcAMP zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration des Botenmoleküls cAMP und parallel dazu inhibiert Coffein das cAMP-spaltende Enzym Phosphodiesterase. Die daraus resultierende Zunahme des *second messenger* Moleküls cAMP in der Spermatozoenzelle beeinflusst unterschiedliche Prozesse, unter anderem die Motilität (Visconti et al., 1999). Betrachtet man die Hyperaktivierung als ein kapazitierungs-assoziiertes Ereignis, dann kann hier von einem kapazitierungs-fördernden Effekt gesprochen werden. Auch die Phosphorylierung verschiedener Spermatozoenproteine wird durch dbcAMP stimuliert (Mensch: Leclerc et al., 1996). Allerdings wird die Bedeutung von cAMP für die Kapazitierung humaner Spermatozoen kontrovers diskutiert. Da keine Effekte des Botenmoleküls auf die Befruchtungsfähigkeit nachgewiesen werden konnten, vermuten Leclerc et al. (1996), daß die Aktivität der cAMP-bildenden Adenylatzyklase durch Bikarbonat, das im Seminalplasma in sehr hohen Konzentrationen vorliegt, bereits stimuliert wurde. Diese Stimulation würde zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentrationen führen und die Aktivierung kapazitierungs-assoziiierter Prozesse wäre dann durch eine zusätzliche Inkubation mit dbcAMP nicht weiter zu verstärken.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen für die Spermatozoen des Weißbüschelaffen vermuten, daß eine hohe intrazelluläre Konzentration des *second messenger* Moleküls cAMP die Kapazitierung stimuliert und durch die Inkubation mit dbcAMP und Coffein dieser stimulierende Effekt allenfalls verstärkt werden kann. Keinesfalls liegt eine kapazitierungs-induzierende Wirkung wie in Makakenspermatozoen vor.

#### 4.6 Einfluß der Gewinnungsmethode

Während der Reifung der Spermatozoen im Nebenhoden, durch die Ejakulation und während der Kapazitierung im weiblichen Genitaltrakt sind die Spermatozoen zu den unterschiedlichsten Sekreten exponiert, die stimulierenden oder inhibierenden Einfluß auf die jeweiligen Prozesse haben. Durch die unterschiedlichen Methoden, die zur Samensammlung bei *Callithrix jacchus* etabliert und in dieser Arbeit benutzt wurden (siehe Kapitel Material & Methoden), sind die Spermatozoen ganz unterschiedlich zu diesen verschiedenen Sekreten exponiert und die Beeinflussung der zu untersuchenden kapazitierungs-assoziierten Prozesse verläuft in unterschiedlichem Ausmaß. Die Art des Einflusses sollte durch den Vergleich der Induzierbarkeit der AR in Abhängigkeit von der Gewinnungsmethode untersucht werden. Die Graphik der Abb. 26 zeigt die erwarteten Ergebnisse: der signifikante Unterschied zwischen dem Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen in der Probe „Epididymis“ und der Probe „Vibrostimulation“ ( $45,1 \pm 6,2 \%$  vs.  $27,5 \pm 2,8 \%$ ;  $p < 0,05$ ) dokumentiert den u.a. für humane Spermatozoen bereits beschriebenen inhibitorischen Effekt des Seminalplasmas auf kapazitierungs- und fertilisierungs-assoziierte Prozesse (Mortimer et al., 1998; Tomes et al., 1998). Die Ergebnisse entsprechen den Befunden der Studie von Yeung et al. (1996) bei *Macaca fascicularis* (Epididymis:  $59,2 \pm 5,9 \%$ ; Elektroejakulation:  $37,7 \pm 4,6 \%$ ). Die Autoren diskutieren als Ursache dieses Unterschiedes die höhere Resistenz der Spermatozoen

nach Elektroejakulation gegen Kapazierungsbedingungen durch die Dekapazierungsfaktoren der Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Die intermediäre Stellung der Probe „Vaginalspülung“ ( $36,8 \pm 3,4$  %) in der vorliegenden Studie demonstriert die Kombination des inhibitorischen Effektes der Dekapazierungsfaktoren des Seminalplasmas und des stimulierenden Effektes der weiblichen Sekrete.

Der Vergleich zeigt, daß in die Interpretation der Daten spermatologischer Untersuchung stets auch die Methode der Spermatozoengewinnung einbezogen werden muß. Außerdem wird deutlich, daß auch die Physiologie der Spermatozoen des Weißbüschelaffen *in vitro* entscheidend durch die Sekrete beeinflußt wird. Sowohl für Untersuchungen zur Physiologie als auch für assistierte Reproduktionstechnologien ist daher die Auswahl der Methode zur Spermatozoengewinnung ein entscheidendes Kriterium, das die Ergebnisse beeinflußt.

### **Einfluß von Kalzium auf Reifungs- und Fertilisationsschritte**

Die zentrale Rolle von Kalzium in den Prozessen der Kapazierung und Akrosomreaktion in den verschiedensten bisher untersuchten Spezies wurde in der vorliegenden Arbeit bereits mehrfach angesprochen. Die Untersuchungen zum Einfluß von Kalzium auf Kapazierung, AR, Proteinphosphorylierung und Bindung an die *Zona pellucida* waren daher ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit, einerseits um den Speziesvergleich zu ermöglichen und andererseits um die Kapazierung der Spermatozoen von *Callithrix jacchus in vitro* erstmalig zu charakterisieren.

#### **4.7 Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf Kapazierung und AR**

Für alle bisher untersuchten Spezies konnte allgemeingültig festgestellt werden, daß extrazelluläres Kalzium obligate Voraussetzung für die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion ist (reviewed in Yanagimachi, 1994). Dagegen ist der Kalziumbedarf während der Kapazierung unklar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, daß nach der Kapazierung in TALP ohne extrazelluläres Kalzium (TALPoC) durch die Inkubation mit dem Ionophor A23187 und paralleler Gabe von Kalzium (2 mM) bei  $51,3 \pm 3,8$  % der Spermatozoen die AR induzierbar war (vgl. Abb. 27). Aus der Tatsache, daß in der Versuchsgruppe, die nur mit dem Ionophor ohne den Zusatz von Kalzium inkubiert wurde, nur  $18,9 \pm 1,2$  % Spermatozoen mit AR reagieren, läßt sich schlußfolgern, daß extrazelluläres Kalzium auch für Spermatozoen des Weißbüschelaffen obligat für die Induktion der AR ist. Dagegen ist der signifikante Anstieg der Spermatozoen mit induzierter AR nach der Induktion mit A23187 + 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ein erster Hinweis darauf, daß extrazelluläres Kalzium für die Kapazierung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen *in vitro* nicht obligat ist.

Fraser (1987) konnte zeigen, daß für die Kapazierung von Mauspermatozoen Kalzium in einer Konzentration von  $\geq 90 \mu\text{M}$  Voraussetzung ist. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß im Medium TALPoC Spuren von Kalzium durch den Proteinzusatz (BSA) oder auch durch absterbende Zellen vorliegen, wurde in einem Kontrollexperiment ein völlig

kalziumfreies System untersucht (Abb. 28). Der signifikante Anstieg des Anteils Spermatozoen mit induzierter AR nach der Kapazitierung in TALPmEGTA bestätigte die Vermutung, daß die Spermatozoen von *Callithrix jacchus* während der Kapazitierung *in vitro* nicht auf die Präsenz von Kalzium angewiesen sind, dagegen die Akrosomreaktion nur mit extrazellulärem Kalzium erfolgen kann.

Um ausschließen zu können, daß es sich bei dieser Beobachtung um eine Besonderheit der Spermatozoen handelt, die durch Vaginalspülung gewonnen wurden, erfolgte in einer weiteren Versuchsreihe die Anwendung des gleichen Versuchsprotokolls für Spermatozoen gewonnen durch Vibrostimulation bzw. Kastration (Abb. 29). Der deutliche Anstieg des Anteils Spermatozoen mit induzierter AR nach der Zugabe von Ionophor und Kalzium bestätigt, daß die Spermatozoen des Weißbüschelaffen ohne extrazelluläres Kalzium *in vitro* kapazitieren können, unabhängig von der vorherigen Exposition zu den verschiedenen Sekreten des weiblichen und oder männlichen Genitaltraktes.

Die signifikante Differenz im Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen nach der Kapazitierung in TALPoC bzw. TALPmC (vgl. Abb. 27) ist nicht nur ein Hinweis darauf, daß die Spermatozoen von *C. jacchus* ohne extrazelluläres Kalzium kapazitieren können, sondern läßt sogar einen inhibitorischen Einfluß des Kations vermuten. Diese Vermutung sollte mittels verschiedener Konzentrationen  $\text{Ca}^{2+}$  im Kapazitierungsmedium überprüft werden (Abb. 30). Der Verlauf des Anteils Spermatozoen mit AR läßt den Schluß einer inhibitorischen Wirkung zu. Allerdings ist der Unterschied zwischen 0 und 1 mM bzw. zwischen 1 und 2 mM nicht signifikant. Die Begründung dafür liegt in der relativ hohen Varianz zwischen den Proben einer Behandlungsgruppe und der geringen Stichprobenzahl. Um den Effekt von Kalzium genauer überprüfen zu können, müssen höhere Stichprobenzahlen mit unterschiedlichen Kalzium-Konzentrationen untersucht werden.

In Bezug auf die Bedingungen für die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion entsprechen die beschriebenen Ergebnisse den Befunden zahlreicher Untersuchung verschiedener Spezies. Auch für die Spermatozoen des Weißbüschelaffen gilt, daß extrazelluläres Kalzium obligate Voraussetzung für dieses exozytotische Ereignis ist. Breitbart & Spungin (1997) konnten zeigen, daß fast alle in die AR involvierten Faktoren auf die Aktivierung durch Kalzium angewiesen sind und der Einstrom von Kalzium einen induzierenden Effekt auf die AR hat. Obwohl verschiedene Theorien über den Mechanismus der AR bestehen (reviewed in Yanagimachi, 1994), zeigen die zahlreichen Untersuchungen zur Signaltransduktion, daß im Grundschema und den Bedingungen der AR nur bedingt spezies-spezifische Unterschiede bestehen. Somit war es nicht überraschend, daß auch die Spermatozoen von *Callithrix jacchus* für dieses Ereignis Kalzium benötigen.

Deutliche spezies-spezifische Unterschiede sind dagegen für die molekularen Mechanismen sowie für die Bedingungen der Kapazitierung dokumentiert. Dies gilt auch für den Kalziumbedarf der bislang untersuchten Arten (siehe Einleitung). Eine erfolgreiche Kapazitierung in kalziumfreiem Milieu, wie hier für die Spermatozoen des Weißbüschelaffen bewiesen, konnte unter anderem für Meerschweinchen (Yanagimachi & Usui, 1974; Hyne & Garbers, 1979), Hamster (Talbot et al., 1976) und Makaken (Vandevoort et al., 1997) gezeigt



werden. Kontrovers sind dagegen die Ergebnisse beispielsweise für Maus und Mensch. Während Fraser (1987) die Notwendigkeit mikromolarer Kalziumkonzentrationen für die Kapazitierung von Mausspermatozoen *in vitro* beweist, beschreiben Aonuma et al. (1979), daß Mausspermatozoen nach Inkubation in kalziumfreiem Medium direkt nach dem Zusatz von Kalzium eine deutliche Hyperaktivität zeigten. Die Autoren schließen daraus, daß die Spermatozoen unter kalziumfreien Bedingungen kapazitierten. Eine ähnliche Situation findet sich in der Literatur für humane Spermatozoen. Während DasGupta et al. (1993) die permanente Präsenz von Kalzium in millimolaren Konzentrationen als Bedingung für eine erfolgreiche Kapazitierung humaner Spermatozoen *in vitro* definieren, zeigen Emiliozzi & Fenichel (1997), daß der Anteil Spermatozoen mit AR nach der Induktion mit Ionomycin gleich ist nach Kapazitierung mit bzw. ohne  $\text{Ca}^{2+}$ . Mortimer et al. (1988) konnten für humane Spermatozoen zeigen, daß während der Kapazitierung  $\text{Ca}^{2+}$  durch Strontium ersetzt werden kann, dies aber nicht für die AR gilt. Auch Marin-Briggiler et al. (1999) zeigten für diese Spezies, daß der Anteil Spermatozoen mit induzierter AR nach Kapazitierung mit Strontium genauso hoch ist wie nach Kapazitierung mit  $\text{Ca}^{2+}$ .

Vor allem die Benutzung verschiedener Parameter und Detektionsverfahren ist vermutlich die Ursache für diese unterschiedlichen Befunde. Während beispielsweise Emiliozzi & Fenichel (1997) die Induzierbarkeit der AR als Charakteristikum einer erfolgreichen Kapazitierung verwendeten, benutzten DasGupta et al. (1993) den CTC-Assay zur Beurteilung der Kapazitierung. Allerdings wird die Fluoreszenz des Antibiotikums Chlortetrazyklin durch die Bindung von Kalzium beeinflusst, so daß die Eignung dieses Assay zur Beurteilung des Kalziumbedarfes fragwürdig erscheint (Perry et al., 1995).

Um den unmittelbaren Vergleich der Befunde dieser Studie mit bereits bekannten Ergebnissen zu ermöglichen und auch, um das etablierte Protokoll zu validieren, wurde auch der Kalziumbedarf während Kapazitierung und Akrosomreaktion für humane Spermatozoen mit diesem Protokoll charakterisiert. Die Abb. 31 zeigt, daß humane Spermatozoen unter absolut kalziumfreien Bedingungen (TALPmEGTA) nicht kapazitieren und daher keine Anstieg im Anteil Spermatozoen mit induziert AR zu beobachten ist. Diese Ergebnisse entsprechen den Befunden von DasGupta et al. (1993), die einen Kalziumbedarf für die Kapazitierung humaner Spermatozoen *in vitro* beschreiben. Die Studie von Emiliozzi & Fenichel (1997) zeigt zwar einen signifikanten Anstieg des Anteils Spermatozoen mit AR nach einer Inkubation ohne den Zusatz von extrazellulärem Kalzium, allerdings können die Autoren die Präsenz von mikromolaren Kalziumkonzentrationen nicht ausschließen.

Im Vergleich mit diesen Ergebnissen des Validierungstests und mit anderen Studien, die die Induzierbarkeit der AR als Charakteristikum benutzen, ergibt sich für die Spermatozoen des Weißbüschelaffen folgende Schlußfolgerung: im Gegensatz zur Akrosomreaktion ist die Kapazitierung ohne extrazelluläres Kalzium möglich. Durch den Einsatz des Kalziumchelators konnte sogar gezeigt werden, daß selbst mikromolare Konzentrationen nicht notwendig sind.

Verschiedene Sachverhalte könnten die Beobachtung einer Kapazitierung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen *in vitro* ohne extrazelluläres Kalzium erklären:

① Die Tatsache, daß Kalzium als Aktivator der verschiedensten Enzyme fungiert und somit auch gegenläufige Prozesse stimulieren kann, bietet eine Erklärungsmöglichkeit dieser Befunde. So wird z.B. sowohl die Adenylatzyklase, das Enzym der cAMP-Synthese, als auch die Phosphodiesterase, das cAMP-spaltende Enzym, durch Kalzium stimuliert (Visconti & Kopf, 1998). Während einer Inkubation ohne extrazelluläres Kalzium würde also beispielsweise die Stimulation der Phosphodiesterase fehlen und damit die Spaltung des *second messenger* Moleküls cAMP inhibiert. Kapazitierungs-assoziierte Prozesse, die durch cAMP reguliert werden, könnten unbeeinflusst ablaufen.

② Für einige kapazitierungs-assoziierte Enzyme sind neben Kalzium weitere Aktivatoren beschrieben. So wird z.B. die Adenylatzyklase auch durch Hydrogenkarbonat stimuliert (Visconti et al., 1995b). Hohe Konzentrationen Hydrogenkarbonat konnten sowohl im Seminalplasma als auch in weiblichen Sekreten nachgewiesen werden (Visconti et al., 1999). Somit könnte auch die Aktivierung kapazitierungs-assoziiierter Prozesse in den Spermatozoen von *C. jacchus* neben oder statt Kalzium von anderen Molekülen übernommen werden.

③ Bei der Betrachtung der akrosom-reagierten Spermatozoen fällt auf, daß der Anteil Spermatozoen mit induzierter AR bei *Callithrix jacchus* mit 47 % (nach PVS) deutlich höher ist, als nach vergleichbaren Inkubationszeiten beispielsweise in humanen Spermatozoen (Emiliozzi & Fenichel, 1997: ca. 26 %). Die Begründung dafür könnte einerseits ein Speziesunterschied sein. Allerdings wäre auch vorstellbar, daß der Reifungsgrad der Spermatozoen zum Zeitpunkt der Ejakulation wesentlich höher ist, als beispielsweise in humanen Spermatozoen und somit die Modifikationen während der Kapazitierung weniger umfangreich wären. Durch eine Arretierung der Spermatozoen in kalziumfreiem Medium, das die Induktion der AR verhindert, könnte somit ein wesentlich höherer Anteil Spermatozoen auf die Zugabe von Induktor und Kalzium mit AR reagieren. Die Untersuchungen zum Einfluß von cAMP auf die Kapazitierung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen zeigten bereits, daß ohne Stimulation ein hoher Anteil Spermatozoen kapazitierte und durch die Inkubation mit dbcAMP eine weitere Steigerung erreicht werden konnte. Ist dies ein Hinweis auf eine sehr hohe Konzentration des Botenstoffes bereits während der Ejakulation und damit eine bereits aktivierte Kapazitierung?

④ Die Prozesse der Kapazitierung in den Spermatozoen von *C. jacchus* sind nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Das benötigte Kalzium entstammt jedoch nicht dem umgebenden Milieu sondern intrazellulären Kalziumdepots. Die Existenz solcher Lager wird seit geraumer Zeit für verschiedene Spezies diskutiert (Parrish et al., 1999).

Um zunächst zu überprüfen, ob es sich bei den Spermatozoen des Weißbüschelaffen tatsächlich um eine kalzium-unabhängige Aktivierung der kapazitierungs-assoziierten Prozesse handelt, wurden weitere Schritte der Fertilisierungskaskade, die

Proteinphosphorylierung und die Bindung an die *Zona pellucida* in Abhängigkeit von extrazellulärem Kalzium betrachtet.

#### 4.8 Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf Proteinphosphorylierung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung zeigen zunächst, daß das Spektrum der isolierten Proteine mit 20 bis ca. 200 kDa in dem Bereich liegt, der auch für humane Spermatozoen beschrieben wurde (Emiliozzi & Fenichel, 1997; Luconi et al., 1996). Auch der direkte Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Spermatozoenzahl (Abb. 31), der zur Sicherung des Beladens der Gele mit konstanten Proteinmengen benutzt wurde, entspricht den Befunden für humane Spermatozoen (Marin-Briggiler et al., 1999).

Die Ergebnisse der Untersuchung zum Einfluß von extrazellulärem Kalzium zeigen, daß die Phosphorylierung verschiedener Proteine der Spermatozoen des Weißbüschelaffen zwischen 20 und 110 kDa unabhängig von Kalzium im Medium verläuft. Die Stärke der ECL-Signale war in Proben, die mit bzw. ohne extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  inkubiert wurden, gleich (exemplarisch Abb. 33). Um die Richtigkeit der Protokolle und damit dieser Ergebnisse zu gewährleisten, wurden in Kontrollversuchen humane Spermatozoen eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Kontrollen zeigten, daß die Phosphorylierung humaner Spermatozoenproteine zwischen 40 und 90 kDa durch Kalzium im Medium inhibiert wird (exemplarisch Abb. 34). Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen verschiedener Untersuchungen der Phosphorylierung humaner Spermatozoenproteine (Emiliozzi & Fenichel, 1997; Luconi et al., 1996; Marin-Briggiler et al., 1999). Die Inhibition der Phosphorylierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  konnte inzwischen auch für Eberspermatozoen (Kalab et al., 1998) gezeigt werden. Yeung et al. (1999) konnten für Spermatozoen von *Macaca fascicularis* eine Abnahme der Phosphorylierung verschiedener Proteine nach der Erhöhung des Kalziumeinstroms durch A23187 in die Zelle zeigen. Die Autoren vermuten die Dephosphorylierung der Proteine durch eine kalziumabhängige Phosphatase, die allerdings nur eine bereits aktivierte Phosphorylierung hemmen kann.

Als weitere molekulare Grundlage für die Inhibition der Phosphorylierung durch Kalzium wird die Regulation der Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A diskutiert. Die Aktivität dieses Enzyms konnte inzwischen für verschiedene Spezies nachgewiesen werden (Maus: Visconti et al., 1995b; Mensch: Leclerc et al., 1996; Rind: Galantino-Homer et al., 1997; Eber: Kalab et al., 1998; Hamster: Visconti et al., 1999). Auch zeigen diese Studien, daß die Aktivität der PKA durch die Inkubation mit dbcAMP und Coffein stimuliert werden kann. Da Kalzium unter anderem stimulierend auf das cAMP-spaltende Enzym Phosphodiesterase wirkt und damit die cAMP-Konzentration in der Zelle abnimmt, ist durch Kalzium die Inhibition der Proteinphosphorylierung möglich.

Luconi et al. (1996) vermuten, daß der inhibitorische Effekt von Kalzium für das korrekte *timing* der Kapazitierung notwendig ist. Bereits in der Einleitung wurde erwähnt, daß für eine erfolgreiche Fertilisierung entscheidend ist, daß kapazitierte Spermatozoen, die zur AR an der *Zona pellucida* fähig sind, auf die Eizelle treffen. Die Phosphorylierung ist ein wichtiger Aktivierungsprozeß in Spermatozoenzellen. Wenn diese Aktivierung ohne Kalzium möglich ist, können so die kapazitierungs- assoziierten Reifungsprozesse ablaufen, die

kalziumabhängige AR wäre jedoch nicht möglich. Weiterführend sehen Kalab et al. (1998) in einer negativen *feedback*-Regulation der Phosphorylierung mittels Kalzium durch die kalzium-stimulierte hohe Aktivität der Phosphodiesterase eine mögliche Adaptation verschiedener Säuger, die Kapazitierung zu verzögern und damit diesen Prozeß mit der Ovulation zu synchronisieren. Auch für *Callithrix jacchus* wäre die Notwendigkeit einer solchen Regulation vorstellbar, da keine äußeren Merkmale den Östrus des Weibchens anzeigen und damit den Paarungszeitpunkt signalisieren.

#### **4.9 Einfluß von extrazellulärem Kalzium auf die *Zona pellucida*-Bindung**

Bevor der Einfluß von Kalzium auf die Bindung der Spermatozoen an die *Zona pellucida* untersucht werden konnte, wurde die Bindungsaffinität der Spermatozoen des Weißbüschelaffen an Eizellen der Maus getestet. Die Ergebnisse dieser Tests zeigen, die Spermatozoen von *C. jacchus* nicht an Eizellen der Maus binden. Diese Resultate demonstrieren, daß eine Funktion der *Zona pellucida* die Gametenerkennung und die Gewährleistung der artspezifischen Bindung ist (Brewis & Wong, 1999). Liu et al. (1991) konnten dagegen zeigen, daß die Spermatozoen von *C. jacchus* nach 2 bis 3 Stunden Inkubation an die *Zona pellucida* salzgelagerter humaner Eizellen binden. Vermutlich aufgrund der engeren Verwandtschaftsbeziehungen war hier eine Bindung von 17 bis > 100 Spermatozoen pro Oocyte möglich. Vandervoort et al. (1992) konnten für *Macaca fascicularis* und *Macaca mulatta* zeigen, daß zwischen diesen eng verwandten Arten Kreuzreaktivität besteht, allerdings nicht so hohe Spermatozoenzahlen erreicht werden, wie in den jeweils homologen Systemen. Da in der vorliegenden Arbeit keine menschlichen Oocyten zur Verfügung standen, wurden die Protokolle zur Beurteilung der Rolle von Kalzium während der Eizell-Spermatozoen-Interaktionen mit homologen Eizellen etabliert. In einem Vergleich der Bindungsaffinität an frischen und an salzgelagerten homologen Oocyten, konnten die Befunde von Yanagimachi et al. (1979) bestätigt werden, daß keine Bindungsunterschiede in Abhängigkeit von der Lagerung der Eizellen bestehen. Aus praktischen Gründen wurden daher salzgelagerte Eizellen eingesetzt.

Die Ergebnisse dieser Tests zeigen, daß die Bindung der Spermatozoen (gewonnen durch VW) an die Eizelle deutlich von Kalzium beeinflusst wird (vgl. Abb. 35). Während in TALPmC  $34,5 \pm 4,6$  Spermatozoen pro Eizelle binden, sind es in TALPoC dagegen nur  $17,7 \pm 2,5$ . Nach dem Zusatz von Kalzium während des Bindungstestes steigt diese Zahl jedoch signifikant auf  $47,2 \pm 1,1$  Spermatozoen pro Eizelle. Allgemein ist die Zahl gebundener Weißbüschelaffen-Spermatozoen pro Eizelle vergleichbar mit anderen Studien zu Spermatozoen-Eizell-Interaktionen in Primaten (Liu et al., 1991; Vandervoort et al., 1992).

Die Daten zeigen deutlich, daß die Bindungsaffinität der Weißbüschelaffen-Spermatozoen auch während einer Kapazitierung ohne extrazelluläres Kalzium etabliert wird. Dieses Ergebnis ist ein zusätzlicher Hinweis auf eine vollständige Kapazitierung der Spermatozoen von *C. jacchus* unabhängig von extrazellulärem Kalzium. Die Daten zeigen aber auch, daß eine signifikant höhere Anzahl von Spermatozoen bindet, wenn Kalzium vorhanden ist. Die Erklärung dafür ist vermutlich die Tatsache, daß die primäre Bindung akrosom-intakter

Spermatozoen an die *Zona pellucida*, die die AR induziert, relativ locker ist und erst die im Anschluß an die AR folgende sekundäre Bindung der akrosom-reagierten Spermatozoen an die ZP eine feste Bindung ist (reviewed in Yanagimachi, 1994). Liu & Baker (1994) konnten für humane Spermatozoen zeigen, daß nur akrosom-intakte Spermatozoen an die ZP, dagegen nur Spermatozoen mit AR an zona-freie Eizellen binden. Die Stärke dieser Bindungen scheint unterschiedlicher Qualität zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eizellen nach den Bindungstest mehreren Waschschrritten unterzogen, so daß primär gebundene Spermatozoen teilweise verloren gehen konnten. Das trotz dieser Prozedur  $17,7 \pm 2,5$  Spermatozoen pro Eizellen gebunden waren, zeigt, daß die primäre oder Initial-Bindung ohne extrazelluläres Kalzium erfolgt. Dies entspricht den Befunden für Spermatozoen von *Macaca fascicularis*, die ebenfalls ohne die Präsenz von Kalzium im Medium an die *Zona pellucida* binden (Tollner et al., 1995). Der Unterschied in der Zahl gebundener Spermatozoen in den Testgruppen TALPoC und TALPmC demonstriert, daß die sekundäre Bindung erst nach der Induktion der AR durch die *Zona pellucida* erfolgt und für diese AR extrazelluläres Kalzium erforderlich ist. Harkema et al. (1998) konnten für Eberspermatozoen zeigen, daß die Bindung von gelösten ZP-Proteinen an die Oberfläche von Spermatozoen deutlich von Kalzium beeinflusst wird: während mit mikromolekularen Kalziumkonzentrationen maximale Bindung zu beobachten ist, sinkt diese nach Zusatz von EGTA signifikant ab. Im Testsystem der vorliegenden Arbeit konnte EGTA nicht eingesetzt werden, da der Chelator zu einer massiven Reduktion der Motilität der Spermatozoen führt, für die Begegnung der Spermatozoen mit der Oocyte jedoch die progressive Motilität der Spermatozoen Voraussetzung ist. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß mikromolekulare Kalziumkonzentrationen auch für die primäre Bindung erforderlich sind.

Unerwartet sind die Ergebnisse des Vergleichs der Gewinnungsmethoden PVS und VW bezüglich der Bindungsaffinität der Spermatozoen (Tab. 7). Zwar zeigen auch die Spermatozoen gewonnen durch Vibrostimulation nach der Kapazisierung in TALPoC und Bindungstest mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  die höchste Bindungsaffinität (vgl. Abb. 36), allerdings überrascht der signifikante Anstieg im Vergleich zu Spermatozoen gewonnen durch VW. Huyser et al. (1997) konnten zeigen, daß die Inkubation mit Seminalplasma die Bindung humaner Spermatozoen an die *Zona pellucida* hemmt. Die Daten der vorliegenden Untersuchung zeigen, daß durch die Aufreinigung der vibrostimulatorisch-gewonnenen Spermatozoen mittels des Percoll-Gradienten das Seminalplasma vollständig entfernt wird. Außerdem demonstrieren die Ergebnisse dieser Studie, die Eignung der PVS zur Gewinnung qualitativ hochwertiger Samenproben. Die geringere Bindungsaffinität der VW-Spermatozoen bei exakt gleicher Behandlung (Aufreinigung, 2 h Kapazisierung, 30 min Inkubation mit salzgelagerten Eizellen) verdeutlicht die wesentlich stärkere Beanspruchung der Spermatozoen durch diese Gewinnungsmethode, die durch den Vergleich der Induzierbarkeit der AR nicht offensichtlich wurde. Diese Befunde dokumentieren die Komplexität der Ereignisse zwischen Ejakulation und Befruchtung und die Notwendigkeit einer umfassenden Charakterisierung.

Unabhängig von den beschriebenen Unterschieden bleiben die Befunde für den Bedarf von extrazellulärem Kalzium bestehen: die Bindungsaffinität der Spermatozoen des Weißbüschelaffen etabliert sich während der Kapazitierung ohne extrazelluläres Kalzium und auch für die primäre Bindung sind keine millimolaren Kalziumkonzentrationen notwendig. Die sekundäre Bindung dagegen, für die Induktion der AR Voraussetzung ist, erfolgt nur, wenn Kalzium im Medium vorliegt.

#### 4.10 Physiologische Induktion der Akrosomreaktion

Nachdem die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen zeigten, daß sowohl die Kapazitierung und die assoziierte Proteinphosphorylierung als auch die primäre Bindung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen ohne extrazelluläres Kalzium erfolgt, dagegen die Induktion der Akrosomreaktion mit dem nicht-physiologischen Induktor A23187  $\text{Ca}^{2+}$  benötigt, wurde dieser Befund mit einem physiologischen Induktor überprüft. Die akrosom-induzierende Wirkung des Steroids Progesteron konnte bereits für verschiedene Spezies bewiesen werden (Mensch: Osman et al., 1989; Pferd: Cheng et al., 1998; Hamster: Llanos et al., 1993.)

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, daß auch in den Spermatozoen des Weißbüschelaffen nach Kapazitierung *in vitro* die Akrosomreaktion mit dem Steroid induziert werden kann (Abb. 38). Der Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen liegt mit  $39,3 \pm 2,7$  % im Vergleich zu humanen Spermatozoen mit  $26 \pm 4,7$  % (Krausz et al., 1995) deutlich höher. Dies entspricht dem Vergleich der Ergebnisse der Induktion der AR mit dem Ionophor A23187. Der Anteil Weißbüschelaffen-Spermatozoen mit induzierter AR nach Inkubation mit Progesteron und A23187 ist gleich, die Reaktion der kapazitierten auf den physiologischen Induktor entspricht der Reaktion auf den nicht-physiologischen. Auch für die Induktion der AR durch Progesteron ist die Präsenz von Kalzium im Medium Voraussetzung, allerdings nicht für die vorausgehende Kapazitierung.

Ein zentrale Frage der Studien zur Wirkung von Progesteron auf Spermatozoen ist, durch welche Mechanismen das Signal des Steroids in der Zelle vermittelt wird. Die Tatsache, daß die Antwort der Spermatozoenzelle auf Progesteron in kürzester Zeit und konzentrationsabhängig erfolgt, macht die Vermittlung durch einen Rezeptor wahrscheinlich (reviewed in Revelli et al., 1994). Die Daten zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Spermatozoen von *Callithrix jacchus* lassen die Existenz eines Rezeptors auch in dieser Spezies vermuten (Abb. 39). Nahezu unabhängig von der Konzentration des Steroids ist der Anteil Spermatozoen mit AR nach der Inkubation mit 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Progesteron (33,1 % vs. 37,5 %). Die Tatsache, daß auch auf minimale Konzentrationen Progesteron eine deutliche Antwort erfolgt, beweist die Existenz einer rezeptor-gesteuerten Signaltransduktion in der Spermatozoenzelle.

Obwohl verschiedene Autoren bereits seit ca. 20 Jahren spezifische Bindungsstellen für Progesteron in Spermatozoen vermuten (reviewed in Revelli et al., 1994), waren u.a. Castilla et al. (1995) nicht in der Lage, den genomischen Steroidrezeptor zu detektieren. Cheng et al. (1998) konnten einen membranständigen Rezeptor nachweisen. Diese für Steroide ungewöhnliche nicht-genomische Bindungsstelle konnte in der vorliegenden Arbeit auch auf

der Oberfläche der Weißbüschelaffen-Spermatozoen detektiert werden (Abb.40). Die Untersuchungen zur Expression dieses membranständigen Rezeptors zeigen, daß die Affinität dieser Bindungsstelle zu Progesteron während der Kapazitierung etabliert wird und unabhängig von Kalzium verläuft. Auch die Bindung des spezifischen Antikörpers an den Progesteronrezeptor ist unabhängig von Kalzium. Diese Ergebnisse belegen, daß in Spermatozoen von *C.jacchus* eine vollständige Kapazitierung einschließlich der Etablierung der Induzierbarkeit der AR ohne extrazelluläres Kalzium erfolgt.

Die Bedeutung von Progesteron *in vivo* wird in jüngerer Zeit kontrovers diskutiert. Während zahlreiche Autoren die Bedeutung vor allem in der Induktion der Akrosomreaktion sehen (siehe Zitate oben), vermutet beispielsweise Blackmore (1999) eher eine chemotaktische Wirkung des von den Kumuluszellen, die die Eizelle umgeben, sezernierten Steroids. Diese Aufgabe der Richtungsanzeige für die im weiblichen Genitaltrakt freibeweglichen Spermatozoen in Richtung befruchtungsfähige Eizelle erscheint sinnvoll. Eher sekundär könnte dagegen die Induktion der AR parallel zur *Zona pellucida* sein.

#### **4.11 Einfluß von intrazellulärem Kalzium**

Alle bisher beschriebenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten zeigen, daß die Kapazitierung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen *in vitro* ohne extrazelluläres Kalzium erfolgt. Dies betrifft sowohl kapazitierungs-assoziierte Prozesse wie die Proteinphosphorylierung als auch die Etablierung der Bindungsaffinität zur *Zona pellucida* und der Induktion der AR durch den physiologischen Induktor. Ein möglicher Erklärungsansatz war die Postulierung des Einflusses intrazellulärer Kalziumdepots (siehe S. 85). Die Existenz solcher Depots wird u.a. für humane Spermatozoen diskutiert (Meizel & Turner, 1993).

Der intrazelluläre Kalziumchelator BAPTA wurde in dieser Arbeit benutzt, um den Einfluß intrazellulärer Kalziumkonzentrationen zu untersuchen. Die Kapazitierung erfolgte in Medium ohne extrazelluläres Kalzium und freies intrazelluläres Kalzium wurde durch die Inkubation mit BAPTA/AM chelatisiert. Die deutliche Reaktion der Spermatozoen der Testgruppe auf die Induktion der AR durch das Ionophor A23187 zeigt, daß auch das intrazelluläre freie Kalzium keinen Einfluß auf den Verlauf der Kapazitierung *in vitro* hat. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (43,5 %) besteht kein signifikanter Unterschied im Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen nach Kapazitierung mit BAPTA (48 %). Für humane Spermatozoen konnten Luconi et al. (1996) zeigen, daß der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in Reaktion auf Progesteron durch BAPTA vollständig inhibiert wird und auch die Phosphorylierung reduziert, aber nicht inhibiert ist. Unbeeinflusst blieb dagegen in dieser Studie die Motilität. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, daß die Kapazitierung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen tatsächlich kalzium-unabhängige Reifungsprozesse umfaßt. In diesem Falle könnte die Regulation der Prozesse durch andere Moleküle (u.a. Hydrogenkarbonat) übernommen werden. Eine andere, ebenfalls plausible Erklärung wäre eine extrem hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration in den Spermatozoen von *C. jacchus* und als Voraussetzung dieser hohen intrazellulären Konzentration die Existenz großer intrazellulärer Kalziumdepots. In diesem Fall würde die Chelatisierung durch BAPTA

nicht ausreichen, um alle freie Kalziummoleküle zu binden. Die Beantwortung dieser Frage erfordert die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration und deren eventuelle Veränderungen im Verlauf der Kapazitierung. Baldi et al. (1996) beschreiben den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration als ein kapazitierungs-assoziiertes Ereignis, daß eine zentrale Rolle in der Steuerung der Kapazitierung einnimmt. Das Fehlen dieses Anstieges würde völlig neue Ansätze der molekularen Grundlagen der Kapazitierung erfordern. Allerdings konnten in der Diskussion der vorliegenden Arbeit deutliche spezies-spezifische Unterschiede aufgezeigt werden, die eine tatsächliche Kalziumunabhängigkeit ebenfalls vorstellbar machen.



## 5. Schlußbemerkungen

Die in der vorliegenden Arbeit erarbeiteten Befunde geben erstmals Aufschluß über die Bedingungen für Kapazitiering, Bindung an die *Zona pellucida* und Akrosomreaktion der Spermatozoen des Neuweltaffen *Callithrix jacchus in vitro*.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, daß die klassischen Kapazitieringförderer Heparin sowie zyklisches Adenosinmonophosphat in Kombination mit Coffein keinen bzw. nur bedingten unterstützenden Einfluß auf die Kapazitiering *in vitro* haben. Dagegen konnte die stimulierende Wirkung weiblicher Sekrete sowie der inhibierende Einfluß des Seminalplasmas auf die Kapazitiering auch für die Spermatozoen des Weißbüschelaffen bestätigt werden.

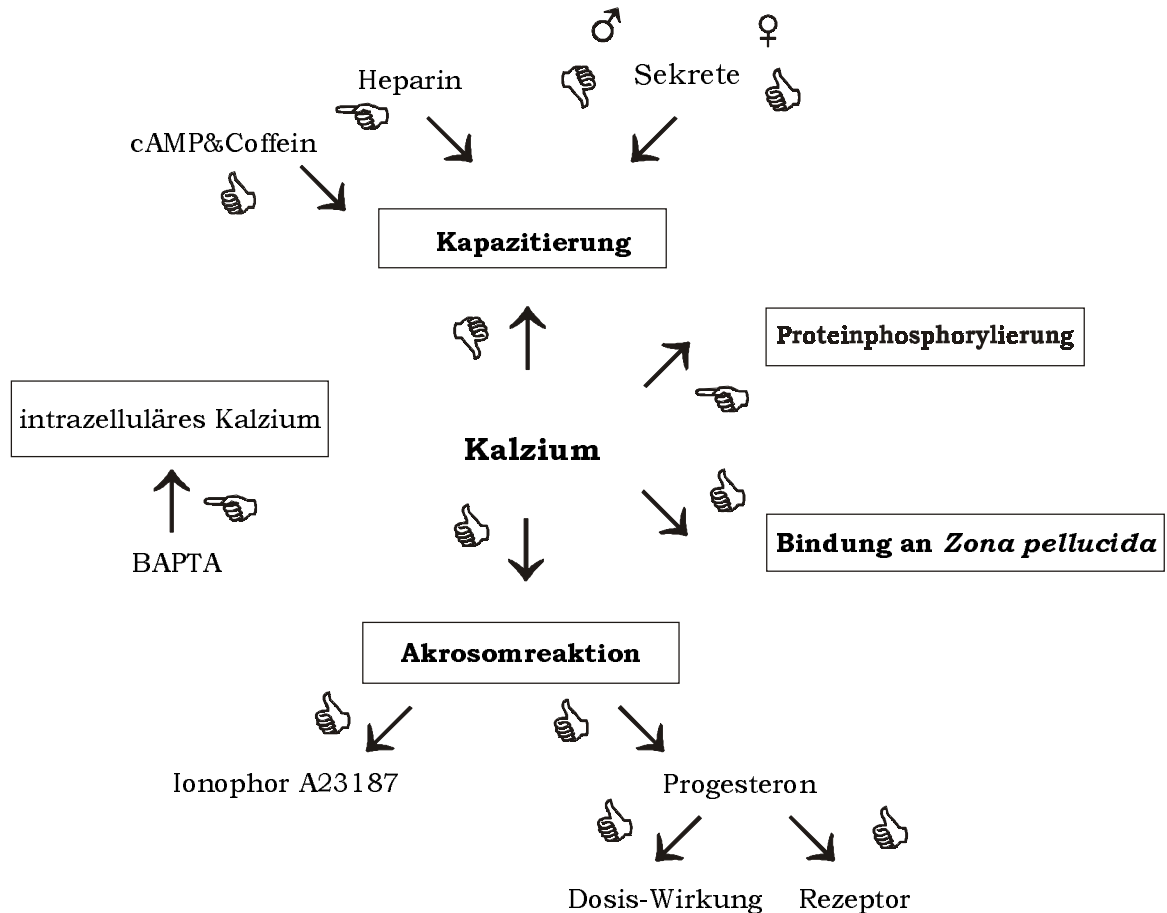
Die zentrale Bedeutung von Kalzium für die einzelnen Reifungs- und Fertilisierungereignisse sowie die Gründe der kontroversen Diskussion in der Literatur werden auch in dieser Studie deutlich. Die Untersuchungen zeigen, daß sowohl die Kapazitiering, die Aktivierung des nicht-genomischen Progesteronrezeptors auf der Oberfläche der Spermatozoen als auch die kapazitiering-assoziierte Proteinphosphorylierung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen ohne den Zusatz von Kalzium zum Medium erfolgen. Eine Kapazitiering unter kalziumfreien Bedingungen konnte in dieser Form erstmals gezeigt werden. In der Diskussion wurde allerdings deutlich, daß die Ursache für diesen Unterschied im Vergleich mit zahlreichen anderen Spezies vermutlich auch in der Verwendung nur bedingt geeigneter Methoden zur Charakterisierung des Kalziumbedarfes während der Kapazitiering begründet liegt. Dagegen konnte entsprechend den aus der Literatur bekannten Befunden für die Spermatozoen des Weißbüschelaffen gezeigt werden, daß sowohl für die (sekundäre) Bindung der Spermatozoen an die *Zona pellucida* als auch für die Akrosomreaktion Kalzium obligat ist.

Die beobachtete Kapazitiering ohne extrazelluläres Kalzium kann verschiedene Erklärungen haben. Eine Möglichkeit ist die Existenz intrazellulärer Kalziumdepots in den Spermatozoen von *Callithrix jacchus*, durch die die intrazelluläre Kalziumkonzentration unabhängig von extrazellulärem Kalzium reguliert werden könnte. Da durch den Einsatz von BAPTA keine Beeinflussung der Kapazitiering möglich war, müßte in weiteren Untersuchungen zum einen die intrazelluläre Kalzium-Konzentration und zusätzlich deren Veränderungen (Anstieg ?) während der Kapazitiering gemessen werden.

Da die Rolle von Kalzium als Initiator oder Regulator der Kapazitiering zur Zeit äußerst kontrovers diskutiert wird (reviewed in Visconti et al., 1998), muß die Steuerung dieser Reifungsprozesse durch andere Moleküle genauer untersucht werden. Die Spermatozoen des Weißbüschelaffen bieten aufgrund der gezeigten Kalzium-Unabhängigkeit der Kapazitiering sehr gute Voraussetzungen für Untersuchungen beispielsweise zum Einfluß von Hydrogenkarbonat. Da dieses Molekül u.a. ein entscheidender Aktivator der Adenylatzyklase ist und damit zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration des *second messenger* Moleküls cAMP führt (reviewed in Baldi et al., 1996), beeinflußt es Kapazitiering und kapazitiering-

assoziierte Prozesse entscheidend. Dieser Einfluß muß in weiterführenden Untersuchungen charakterisiert werden.

Die Graphik der Abbildung 43 soll abschließend einen Überblick über die Befunde der vorliegenden Arbeit geben. Dabei sind die stimulierenden (☺) und inhibitorischen (☹) Effekte sowie keine Beeinflussung (☹) gekennzeichnet.



**Abb. 43** Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Studie

Die Ergebnisse zeigen einen stimulierenden Effekt von dbcAMP und Coffein auf die Kapazitätierung des Spermatozoen des Weißbüschelaffen. Keine Wirkung konnte für das Glykosaminoglykan Heparin nachgewiesen werden. Die für verschiedene Spezies beschriebene stimulierende Wirkung der Sekrete des weiblichen und die inhibitorische Wirkung der Sekrete des männlichen Genitaltraktes konnten auch für die Spermatozoen dieses Krallenaffen bestätigt werden. Die zentrale Bedeutung von Kalzium wurde durch die Untersuchung einzelner Ereignisse der Kapazitätierungs- und Fertilisierungskaskade deutlich. Während die Kapazitätierung als Gesamtheit und auch die assoziierte Proteinphosphorylierung unabhängig von extrazellulärem Kalzium ablaufen, sind sowohl die Bindung an die *Zona*

*pellucida* als auch die Induktion der Akrosomreaktion (durch Progesteron oder durch Kalziumionophor) auf die Präsenz von Kalzium angewiesen.

Drei Schwerpunkte erklären die Bedeutung der Ergebnisse dieser Studie zur Physiologie der Spermatozoen des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) *in vitro*. Zunächst haben die Befunde eine rein praktische Bedeutung, da die etablierten Protokolle zur Präparation der Samenproben der verschiedenen Gewinnungsmethoden und die Vergleiche der verschiedenen Aufreinigungs-techniken den Einsatz von nicht-invasiv gewonnenen Ejakulaten in verschiedene assistierte Reproduktionstechnologien ermöglichen. Durch die Etablierung der Verwendung von Spermatozoen gewonnen durch Vaginalspülung oder penile Vibrostimulation wird u.a. der wiederholte Einsatz genetisch wertvoller Männchen in Techniken wie IVF oder intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) möglich.

Neben dieser praktischen Bedeutung tragen die Ergebnisse dieser Arbeit auch wesentlich zur Erweiterung des Grundlagenwissens über die Ereignisse der Kapazitierungs- und Fertilisierungskaskade bei. Erstmals wurden diese Prozesse für die Spermatozoen eines Vertreter der nicht-menschlichen Neuweltaffen untersucht. Der dadurch ermöglichte Speziesvergleich und die erneute Bestätigung der Existenz von spezies-spezifischen Unterschieden erweitert das Verständnis für die Komplexität der Prozesse. Allerdings muß hervorgehoben werden, daß es sich um Erkenntnisse aus einer *in-vitro*-Studie handelt und nur in beschränktem Maße Rückschlüsse auf die Verhältnisse *in vivo* gezogen werden können.

Da diese Untersuchung zu den wenigen gehört, die verschiedene Teilschritte innerhalb einer Art unter gleichen Bedingungen untersucht, können neue Ansätze für die Erklärungen der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Ereignissen gefunden werden. Insbesondere die Diskussion um die Rolle von Kalzium wird durch die Befunde unterstützt und die Ergebnisse zeigen deutlich, das weitere Kandidaten als wichtige Botenmoleküle betrachtet werden müssen. Somit besteht die Bedeutung dieser Ergebnisse also nicht nur in der ersten Charakterisierung der Ereignisse innerhalb einer Vertreters der Krallenaffen sondern vor allem auch im Beitrag zum grundsätzlichen Verständnis der Mechanismen der Kapazitierung von Spermatozoen *in vitro*.

## 6. Zusammenfassung

Die Entwicklung befruchtungsfähiger Spermatozoen ist ein komplexer Prozeß, der aus zahlreichen physiologischen Interaktionen der Spermatozoen mit den Geweben des männlichen und des weiblichen Reproduktionsapparates resultiert. Die zahlreichen Veränderungen während des letzten Abschnittes der Reifung der Spermatozoen werden unter dem Begriff Kapazitierung zusammengefaßt. Dazu gehören verschiedenste physiologische, morphologische und funktionelle Veränderungen, deren Mechanismen bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Die Veränderungen im Verlauf der Kapazitierung befähigen die Spermatozoen zur Bindung an die *Zona pellucida* sowie zu einer erfolgreichen Akrosomreaktion. Als Akrosomreaktion beschreibt man die exozytotische Freisetzung der Enzyme des Akrosoms. Mittels dieser Enzyme ist das Spermatozoon dann in der Lage, die *Zona pellucida* zu lysieren und in die Eizelle einzudringen.

Trotz zahlreicher Untersuchungen seit der ersten Beschreibung der Kapazitierung als unabdingbare Voraussetzung der Fertilisation sind die molekularen Grundlagen und die Mechanismen der zellulären Veränderungen noch weitgehend ungeklärt. Gleiches gilt für die Akrosomreaktion, über deren Induktion und Mechanismus verschiedene Theorien bestehen.

Zahlreiche Untersuchungen an Spermatozoen von Mensch sowie von Nutz- und Haustieren beschäftigen sich mit den Mechanismen der Kapazitierung sowie den beeinflussenden Faktoren. Dagegen liegen über die Spermatozoen von nicht-menschlichen Primaten nur sehr beschränkte Kenntnisse über Kapazitierung und Akrosomreaktion *in vitro* vor. Bis heute sind keine Studien zur Charakterisierung der Kapazitierung der Spermatozoen bei Krallenaffen bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die erstmalige Charakterisierung der Physiologie der Spermatozoen des Weißbüschelaffen *Callithrix jacchus in vitro*. Die Ergebnisse sollten dazu beitragen, Aufschluß über die Bedingungen für Kapazitierung, Bindung an die *Zona pellucida* und Akrosomreaktion *in vitro* der Spermatozoen eines Vertreters der Neuweltaffen zu erhalten. Diese Befunde ermöglichen einerseits die Erweiterung des Grundlagenwissens sowie den Speziesvergleich und andererseits die Etablierung und Verbesserung assistierter Reproduktionstechnologien.

Die Untersuchungen der Studie lassen sich in drei Hauptabschnitte untergliedern.

Im ersten Abschnitt wurden Methoden zur Aufreinigung und zur Detektion lebender Spermatozoen mit Akrosomreaktion etabliert und verglichen. Die Ergebnisse zeigen, daß nach der Aufreinigung der Samenproben durch *swim up* und Dichtegradienten-Zentrifugation keine Unterschiede im Anteil lebender Spermatozoen und im Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen bestehen. Als praktikable Methode zur Detektion lebender Spermatozoen mit Akrosomreaktion erwies sich die kombinierte Fluoreszenzmarkierung mit dem Vitalfarbstoff Hoechst 33258 und dem FITC-markierten *Pisum sativum* Agglutinin.

Der zweite Abschnitt beinhaltet die grundlegende Charakterisierung des Verlaufs der Kapazitierung der Spermatozoen des Weißbüschelaffen *in vitro*. Die Ergebnisse zeigen, daß bereits nach einer zweistündigen Inkubation unter Kapazitierungsbedingungen ein deutlicher Anstieg des Anteils Spermatozoen mit induzierter Akrosomreaktion zu beobachten ist. Der inhibierende Einfluß der Sekrete des männlichen und der stimulierende Einfluß der Sekrete des weiblichen Genitaltraktes auf Kapazitierung und Akrosomreaktion konnte durch den Vergleich der Spermien unterschiedlicher Gewinnungsmethoden (*vaginal washing*, penile Vibrostimulation und Kastration) nachgewiesen werden. Der stimulierende Einfluß aus der Literatur bekannter Kapazitierungsförderer konnte allerdings für die Spermatozoen von *Callithrix jacchus* nicht bestätigt werden.

Der dritte Abschnitt dieser Studie galt den Untersuchungen zur Rolle von extrazellulärem Kalzium in den verschiedenen Prozessen der Kapazitierungs- und Fertilisierungskaskade. Dem in somatischen Zellen weitverbreiteten Botenmolekül Kalzium kommt auch in der Steuerung verschiedener Prozesse in Spermienzellen eine zentrale Bedeutung zu. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Spermatozoen des Weißbüschelaffen *in vitro* ohne extrazelluläres Kalzium kapazitieren und das auch die kapazitierungs-assoziierte Phosphorylierung verschiedener Proteine ohne extrazelluläres Kalzium erfolgt. Die Aktivierung des nicht-genomischen Progesteronrezeptors auf der Oberfläche der Spermatozoen erfolgt ebenfalls während der Inkubation unter kalziumfreien Bedingungen. Dagegen kann die Akrosomreaktion sowohl mit dem Kalziumionophor A23187 als auch mit Progesteron nur unter der Präsenz von extrazellulärem Kalzium induziert werden. Die Tests zur Bindungsaffinität *in vitro* kapazitierter Spermien zeigen, das die Bindungsfähigkeit zwar während der Kapazitierung unter kalziumfreien Bedingungen etabliert wird, allerdings für die (sekundäre) Bindung selbst wiederum die Präsenz von Kalzium im Medium obligat ist.

Untersuchungen zum Einfluß des intrazellulären Kalziums auf die Kapazitierung zeigen, daß auch nach der Bindung des Kalziums durch einen intrazellulär aktiven Chelatbildner die Spermatozoen von *C. jacchus in vitro* kapazitieren. Diese Ergebnisse verstärken die Hinweise auf eine kalziumfreie, durch andere Botenmoleküle vermittelte Kapazitierungsreaktion.

Die Bedeutung der Ergebnisse der vorliegenden Studie ist mit zwei verschiedenen Standpunkten zu betrachten. Aus praktischer Sicht tragen die Ergebnisse u.a. entscheidend zur Verbesserung der Protokolle der assistierten Reproduktionstechnologien (z.B. IVF) bei. Vom biologischen Standpunkt aus betrachtet, tragen die Befunde wesentlich zur Erweiterung des Grundlagenwissens über die Physiologie von Spermien *in vitro* bei und ermöglichen die Einbeziehung eines Vertreters der Neuweltaffen in die Speziesvergleiche. Die Beschreibung einer Kapazitierungsreaktion unter kalziumfreien Bedingungen unterstützt die kontroverse Diskussion in der Literatur zur Rolle von Kalzium und eröffnet neue Ansätze für die Untersuchungen der molekularen Mechanismen sowie weiterer Regulatoren der Kapazitierungs- und Fertilisierungskaskade.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abe, H, Sendai, Y, Satoh, T, and Hoshi, H** (1995) Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa *in vitro*. *Mol. Reprod. and Develop.*, 42: 226-232
- Aitken, RJ, Buckingham, DW, Harkiss, D, Paterson, M, Fisher, H, and Irvine, DS** (1996) The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation. *Mol. and Cell. Endocrin.*, 117: 83-93
- Amin, AH, Bailey, JL, Storey, BT, Blasco, L, and Heyner, S** (1996) A comparison of three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 11 (4): 741-745
- Anand, SR, Atreja, SK, Chauhan, MS, and Behl, R** (1989) *In vitro* capacitation of goat spermatozoa. *Indian J. of Exp. Biology*, 27: 921-924
- Aonuma, S, Okabe, M, Kawaguchi, M, and Kishi, Y** (1980) Studies on sperm capacitation. IX. Movement characteristics of spermatozoa in relation to capacitation. *Chem. Pharm. Bull.*, 28 (5): 1497-1502
- Austin, CR** (1967) Capacitation of spermatozoa. *Int. J. of Fertility*, 12 (1): 25-31
- Baldi, E, Casano, R, Falsetti, C, Krausz, C, Maggi, M, and Forti, G** (1991) Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. of Andrology*, 12 (5): 323-330
- Baldi, E, Krausz, C, and Forti, G** (1995) Nongenomic actions of progesterone on human spermatozoa. *Trends in Endocrin. and Metab.*, 6 (6): 198-205
- Baldi, E, Luconi, M, Bonaccorsi, L, Krausz, C, and Forti, G** (1996) Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front. Biosci*, 1: 189-205
- Bavister, BD, Boatman, DE, Leibfried, L, Loose, M, and Vernon, MW** (1983) Fertilization and cleavage of rhesus monkey oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 28: 983-999
- Bedford, JM** (1974) Biology of primate spermatozoa. *Contrib. Primat.*, 3: 97-139
- Bedford, JM and Cross, NL** (1998) Sperm capacitation. In: Knobil, E and Neill, JD: *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press: 597-602
- Bell** (1982) *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. Croom Helm, London
- Berridge, MJ and Bootman, MD** (1996) Calcium signaling. In: Heldin, CH and Purton, M: *Signal Transduction*. Chapman & Hall: 203-221
- Blackmore, PF** (1999) Extragenomic actions of progesterone in human sperm and progesterone metabolites in human platelets. *Steroids*, 64: 149-156

- Boatman, DE** (1997) Responses of gametes to the oviductal environment. *Human Reproduction*, 12, Natl. Suppl.: 133-149
- Boatman, DE, Andrews, JC, and Bavister, BD** (1988) A quantitative assay for capacitation: evaluation of multiple sperm penetration through the *zona pellucida* of salt-stored hamster eggs. *Gamete Research*, 19: 19-29
- Boatman, DE and Bavister, BD** (1982) Cyclic nucleotide mediated stimulation of rhesus monkey sperm fertilizing ability. *J. Cell. Biol.*, 95: 153-
- Boatman, DE and Bavister, BD** (1984) Stimulation of rhesus monkey sperm capacitation by cyclic nucleotide mediators. *J. Reprod. Fertil.*, 71: 357-366
- Breitbart, H and Spungin, B** (1997) The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol. Human Reproduction*, 3 (3): 195-202
- Brewis, IA and Wong, CH** (1999) Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg *zona pellucida*. *Reviews of Reproduction*, 4: 135-142
- Burkman, LJ** (1995) The motility of human spermatozoa before and after capacitation. In: Grudzinski, JG and Yovich, JL: *Gametes - The spermatozoon*. Cambridge University Press: 122-139
- Calvo, L, Dennison-Lagos, L, Banks, SM, Fugger, EF, and Sherins, RJ** (1993) Chemical composition and protein source in the capacitation medium significantly affect the ability of human spermatozoa to undergo follicular fluid induced acrosome reaction. *Human Reproduction*, 8 (4): 575-580
- Castilla, JA, Gil, T, Molina, J, Hortas, ML, Rodriguez, F, Torres-Munoz, J, Vergara, F, and Herruzo, A** (1995) Undetectable expression of genomic progesterone receptor in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 10 (7): 1757-1760
- Centola, GM, Mattox, JH, Burde, S, and Leary, JF** (1990) Assessment of the Viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Mol. Reprod. Develop.*, 27: 130-135
- Chan, PJ, Hutz, RJ, and Dukelow, WR** (1982) Nonhuman primate *in vitro* fertilization: seasonality, cumulus cells, cyclic nucleotides, ribonucleic acid, and viability assays. *Fertil. Steril.*, 38 (5): 609-615
- Chandonnet, L, Roberts, KD, Chapdelaine, A, and Manjunath, P** (1990) Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. and Develop.*, 26: 313-318
- Chang, MD** (1951) Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature *in vitro* on their subsequent fertilization and activation *in vivo*. *J. Exp. Zool.*, 121: 351-371
- Cheng, FP, Fazeli, AR, Voorhout, WF, Tremoleda, JL, Bevers, MM, and Colenbrander, B** (1998) Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances *in vitro* binding to the *zona pellucida*. *Int. J. of Andrology*, 21: 57-66

- Chian, R and Sirard, MA** (1995) Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biology of Reproduction*, 52: 156-162
- Clegg, ED** (1983) Mechanisms of mammalian sperm capacitation. *Mech. and Control of Animal Fertilization*, 177-212
- Cohen-Dayag, A and Eisenbach, M** (1994) Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am. J. Physiol.*, 267: 1167-1176
- Cordoba, M, Santa-Coloma, TA, Beorleguni, NB, and Beconi, MT** (1997) Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm. *Biochem. and Mol. Biology International*, 41 (4): 725-733
- Cross, NL, Morales, P, Fukuda, M, and Behboodi, E** (1989) Determining acrosomal status of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy. *Am. J. of Primatology*, 17: 157-163
- Cross, NL, Morales, P, Overstreet, JW, and Hanson, FW** (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.*, 15: 213-226
- Cui, K** (1996) The effect of stress on semen reduction in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Human Reproduction*, 11, no.3: 568-573
- Cui, K, Flaherty, SP, Newble, CD, Guerin, MV, Napier, AJ, and Matthews, CD** (1991) Collection and analysis of semen from common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J. of Andrology*, 12, no.3: 214-220
- Cummins, JM** (1995) Tests of sperm function. In: Grudzinskas, JG and Yovich, JL: *Gametes - The spermatozoon*, Cambridge University Press: 70-103
- Cummins, JM, Pember, SM, Jequier, AM, Yovich, JL, and Hartmann, Pe** (1991) A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. relationship to fertility and other seminal parameters. *J. of Andrology*, 12: 98-103
- DasGupta, S, Mills, CL, and Fraser, LR** (1993) Ca<sup>2+</sup>-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.*, 99: 135-143
- Davis, BK** (1978) Effect of calcium on motility and fertilization by rat spermatozoa *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 157: 54-56
- Davis, BK, Byrne, R, and Hungund, B** (1979) Studies in the mechanism of capacitation: II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation *in vitro*. *Bioch. et Bioph. Acta*, 558: 257-266
- de Lamirade, E, Leclerc, P, and Gagnon, C** (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Human Reproduction*, 3 (3): 175-194
- Dukelow, WR, Chernoff, HN, and Williams, WL** (1966) Enzymatic characterization of decapacitation factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121: 396-398
- Dunbar, BS, Wardrip, NJ, and Hedrick, JL** (1980) Isolation, physicochemical properties, and



- macromolecular composition of *Zona pellucida* from porcine oocytes. *Biochemistry*, 19: 356-365
- Duncan, AE and Fraser, LR** (1993) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation *in vitro*: identification of an  $M_r$  95 000 phosphotyrosine-containing protein. *Reprod. Fertil.*, 97: 287-299
- ELy, M** (1995) Diplomarbeit, FB Biologie, Philipps-Universität Marburg
- Emiliozzi, C and Fenichel, P** (1997) Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. *Biology of Reproduction*, 56: 674-679
- Fayrer-Hosken, RA and Brackett, BG** (1987) Use of salt-stored *zonae pellucidae* for assessing rabbit sperm capacitation for *in vitro* fertilization. *Gamete Res.* 17: 191-201
- Fazeli, A** (1996) Clinical and physiological aspects of sperm Zona pellucida interaction. Dissertation
- Franken, DR** (1998) The clinical significance of sperm-zona pellucida binding. *Front. Biosci.*, 3: 247-253
- Fraser, LR** (1987) Minimum and maximum extracellular  $Ca^{2+}$  requirements during mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 81: 77-89
- Fraser, LR and McDermott, CA** (1992)  $Ca^{2+}$ -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J. Reprod. Fertil.*, 96: 363-377
- Galantina-Homer, H, Visconti, PE, and Kopf, GS** (1997) Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5' monophosphate-dependent pathway. *Biology of reproduction*, 56: 707-719
- Gilchrist, RB, Nayudu, PL, and Hodges, JK** (1997) Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 56: 238-246
- Green, DPL** (1978) The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J. Cell. Sci.*, 32: 137-151
- Handrow, RR, Boehm, SK, Lenz, RW, Robinson, JA, and Ax, RL** (1984) Specific binding of the glycosaminoglycan  $H^3$ -Heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa *in vitro*. *J. of Andrology*, 5: 51-63
- Handrow, RR, Parrish, JJ, and Susko-Parrish, JL** (1986) Effect of glycosaminoglycans on capacitation and the acrosome reaction of bovine and hamster sperm. *Biology of Reproduction*, suppl. 34: 93
- Harkema, W, Harrison, RA, Miller, NG, Topper, EK, and Woelders, H** (1998) Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of the intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biology of Reprod*, 58: 421-430
- Henkel, R, Franken, DR, and Habenicht, UF** (1998) Zona pellucida as physiological trigger for the induction of acrosome reaction. *Andrologia*, 30: 275-280
- Henkel, R, Muller, C, Miska, W, Gips, H, and Schill, WB** (1993) Determination of the

- acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. Human Reproduction, 8 (12): 2128-2132
- Hinsch, E, Ponce, AA, Hägele, W, Hedrich, F, Müller-Schlösser, F, Schill, WB, and Hinsch, KD** (1997) A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. Human Reproduction, 12 (8): 1673-1681
- Huysen, C, le R.Fourie, F, and Moolman, H** (1997) The influence of sera, follicular fluid and seminal plasma on human sperm-zona pellucida binding. Human Reproduction, 12 (4): 792-799
- Hyne, RV and Garbers, DL** (1979) Calcium-dependent increase in adenosine 3'5'-monophosphate and induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (11): 5699-5703
- Jeyendran, RS, Van der Ven, HH, Perez-Pelaez, M, Crabo, BG, and Zaneveld, LJD** (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J.Reprod.Fertil., 70: 219-228
- Kalab, P, Peknicova, J, Geussova, G, and Moos, J** (1998) Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. Mol. Reprod. and Develop., 51: 304-314
- Kalab, P, Visconti, P, Leclerc, P, and Kopf, GS** (1994) p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. J. Biol.Chemistry, 269 (5): 3810-3817
- Kaul, C, Gandhi, KK, and Anand, SR** (1997) Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa assessed by chlortetracycline assay. Andrologia, 29 (5): 243-251
- Kawakami, E, Vandervoort, CA, Mahi-Brown, CA, and Overstreet, JW** (1993) Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. Biology of Reproduction, 48: 841-845
- Kholkute, SD, Llan, Y, Roudebush, WE, and Dukelow, WR** (1990) Capacitation and the acrosome reaction in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) spermatozoa evaluated by the chlortetracycline fluorescence assay. Am. J. of Primatology, 20: 115-125
- Koehler, JK** (1981) Surface alterations during the capacitation of mammalian spermatozoa. Am. J. of Primatology, 1: 131-141
- Krausz, C, Bonaccorsi, L, Luconi, M, Fuzzi, B, Criscuoli, L, Pellegrini, S, Forti, G, and Baldi, E** (1995) Intracellular calcium increase and acrosome reaction in response to progesterone in human spermatozoa are correlated with *in-vitro* fertilization. Human Reproduction, 10, (1): 120-124
- Kuederling, I, Morrell, JM, and Nayudu, PL** (1996) Collection of semen from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) for experimental use by vaginal washing. Laboratory Animals, 30: 260-266

- Kumar, RA and Phillips, DM** (1991) Spermiation and sperm maturation in the marmoset. *The Anat. Rec.*, 229: 315-320
- Laemmli, UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Lanzendorf, SE, Holmgren, WJ, Johnson, DE, Scobey, MJ, and Jeyendran, RS** (1992) Hemizona assay for measuring zona binding in the lowland gorilla. *Mol. Reprod. and Develop.*, 31: 264-267
- Leclerc, P, de Lamirade, E, and Gagon, C** (1996) Cyclic adenosine 3',5' Monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of Reproduction*, 55: 684-692
- Leclerc, P and Goupil, S** (2000) Distribution and localization of calmodulin-binding proteins in bull spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 62 (6): 1875-1881
- Leclerc, P, Langlais, J, Lambert, RD, Sirard, MA, and Chafouleas, JG** (1989) Effect of heparin on the expression of calmodulin-binding proteins in bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 85 (2): 615-622
- Lee, CYG, Khorasani, AM, and Dorjee, S** (1998) Assessment of progesterone-induced acrosome reaction by biotinylated monoclonal antibody probes. *Am. J. of Reproductive Immunology*, 39: 164-171
- Lee, MA and Storey, BT** (1985) Evidence of plasma membrane impermeability to small ions in acrosome-intact mouse spermatozoa bound to mouse zona pellucidae, using an Aminoacridine fluorescent pH probe: time course of the zona-induced acrosome reaction monitored by both Chlorotetracycline and pH probe fluorescence. *Biology of Reproduction*, 33: 235-246
- Lee, MA, Trucco, GS, Bechtol, KB, Wummer, N, Kopf, GS, Blasco, L, and Storey, BT** (1987) Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by a chlorotetracycline fluorescence assay. *Fertil. Steril.*, 48 (4): 649-658
- Leyton, L and Sailing, P** (1989) 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell*, 57: 1123-1130
- Liu, DY and Baker, HWG** (1994) A new test for the assessment of sperm-zona pellucida penetration: relationship with results of other sperm tests and fertilization *in vitro*. *Human reproduction*, 9 (3): 489-496
- Liu, DY, Lopata, A, Pantke, P, and Baker, HWG** (1991) Horse and marmoset monkey sperm bind to the *zona pellucida* of salt stored human oocytes. *Fertil. Steril.*, 56 (4): 764-767
- Llanos, MN, Morales, PJ, Anabalón, MC** (1993) Characterization of the progesterone induced hamster sperm acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, suppl 1: 106
- Lopata, A, Summers, PM, and Hearn, JP** (1988) Births following the transfer of cultured embryos obtained by *in vitro* and *in vivo* fertilization in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Fertility and Sterility*, 50 (3): 503-509

- Luconi, M, Bonaccorsi, L, Krausz, C, Gervasi, G, Forti, G, and Baldi, E** (1995) Stimulation of protein phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa. *Mol. and Cell. Endocrinology*, 108: 35-42
- Luconi, M, Krausz, C, Forti, G, and Baldi, E** (1996) Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human sperm. *Biology of Reproduction*, 55: 207-216
- Mahanes, MS, Ochs, DL, and Eng, LA** (1986) Cell calcium of ejaculated rabbit spermatozoa before and following in vitro capacitation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 134 (2): 664-670
- Mahmoud, AI and Parrish, JJ** (1996) Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. *Mol. Reprod. and Develop.*, 43: 554-560
- Mahony, MC and Gwathmey, TY** (1999) Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 60: 1239-1243
- Mahony, MC, Lanzendorf, S, Gordon, K, and Hodgen, GD** (1996) Effects of caffeine and dbcAMP on Zona pellucida penetration by epididymal spermatozoa of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Mol. Reprod. Develop.*, 43: 530-535
- Mallidis, C, Howard, EJ, Baker, HW** (1991) Variation of semen quality in normal men. *Int. J. Androl.*, 14 (2): 99-107
- Marin-Briggiler, CI, Vazquez-Levin, MH, Gonzalez-Echeverria, F, Blaquier, JA, Tezon, JG, and Miranda, PV** (1999) Strontium supports human sperm capacitation but not ollicular fluid-induced acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 61: 673-680
- Marson, J, Meuris, S, Gervais, D, Cooper, RW, and Jouannet, P** (1988) Cellular and biochemical characteristics of semen obtained from pubertal chimpanzees by masturbation. *J. Reprod. Fertil.*, 82: 199-207
- Mastroianni, L and Stambaugh, R** (1974) Secretory function of the primate oviduct. In: Coutinho, Elsimar eds. *Physiology and Genetics of Reproduction*, 25-34
- Meizel, S and Turner, KO** (1986) Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of previously capacitated hamster sperm. *J. Exp. Zool.*, 237 (1): 137-139
- Meizel, S and Turner, KO** (1993) Initiation of the human sperm acrosome reaction by thapsigargin. *J. Exp. Zool.*, 267: 350-355
- Mendoza, C and Tesarik, J** (1993) A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium. *FEBS*, 330: 57-60
- Menezo, Y and Guerin, P** (1997) The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *E. J. of Obstetrics and Gynecology*, 73: 99-104
- Miller, DJ, Winer, MA, and Ax, RL** (1990) Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, 42:

899-915

- Millette, CF** (1998) Spermatozoa. In: Encyclopedia of Reproduction. eds. Knobil, E and Neill, JD. Academic Press: 586-596
- Miska, W, Fehl, P, and Henkel, R** (1994) Biochemical and immunological characterization of the acrosome reaction-inducing substance (ARIS) of hFF. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 199 (1): 125-129
- Miyamoto, H and Chang, MC** (1973) The importance of serum albumin and metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 32: 193-205
- Miyamoto, H and Ishibashi, T** (1975) The role of calcium ions in fertilization of mouse and rat eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 45: 523-526
- Morrell, JM, Kuederling, I, and Hodges, JK** (1996) Influence of semen collection method on ejaculate characteristics in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. *Int. J. of Andrology*, 17: 164-172
- Mortimer, D, Chorney, MJ, Curtis, EF, and Trounson, AO** (1988) Calcium dependence of human sperm fertilizing ability. *J. Exp. Zool.*, 246: 194-201
- Mortimer, ST, Swan, MA, and Mortimer, D** (1998) Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13 (8): 2139-2146
- Müller, K, Pomorski, T, Müller, P, and Herrmann, A** (1999) Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J Cell Sci*, 112: 11-20
- Navaneetham, D, Sivashanmugam, P, and Rajalakshmi, M** (1996) Changes in binding of lectins to epididymal, ejaculated, and capacitated spermatozoa of the rhesus monkey. *The Anat. Rec.*, 245: 500-508
- Naz, RK and Ahmad, K** (1991) Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J. Cell Sci.*, 99: 157-165
- Osman, RA, Andria, ML, Jones, AD, and Meizel, S** (1989) Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Bioch. Biophys. Res. Com.*, 160: 823-833
- Palomo, MJ, Mogas, T, Izquierdo, MD, and Paramio, MT** (1995) Effect of heparin and sperm concentration on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 43: 292
- Pampiglione, JS, Tan, SL, and Campbell, S** (1993) The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 59 (6): 1280-1284
- Parker, NA, Bailey, TL, Bowen, JM, Ley, WB, Purswell, BJ, and Dascanio, JJ** (2000) In vitro and xenogenous capacitation-like changes of fresh, cooled, and cryopreserved stallion sperm as assessed by a chlortetracycline stain. *J. of Andrology*, 21(1): 45-52
- Parrish, JJ, Susko-Parrish, JL, and Graham, JK** (1999) In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology*, 51: 461-472

- Parrish, JJ, Susko-Parrish, JL, Handrow, RR, Sims, MM, and First, NL** (1989) Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biology of Reproduction*, 40: 1020-1025
- Parrish, JJ, Susko-Parrish, JL, Uguz, C, and First, NL** (1994) Differences in the role of cyclic adenosine 3, 5 - monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biology of Reproduction*, 51: 1099-1108
- Perry, RL, Naeni, M, Barratt, CLR, Warren, MA, and Cooke, ID** (1995) A time course study of capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa using a revised chlortetracycline pattern classification. *Fertil. Steril.*, 64: 150-159
- Pintado, B, de la Fuente, J, and Roldan, ERS** (2000) Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil.*, 118: 145-152
- Revelli, A, Modotti, M, Pfiffaretti-Yanez, A, Massobrio, M, and Balerna, M** (1994) Steroid receptors in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 9 (5): 760-766
- Robertson, L, Wolf, DP, and Tash, JS** (1988) Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biology of Reprod.*, 39: 797-805
- Roth, TL, Weiss, RB, Buff, JL, Bush, LM, Wildt, DE, and Bush, M** (1998) Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Biology of Reproduction*, 58: 475-482
- Sabeur, K, Edwards, DP, and Meizel, S** (1996) Human sperm plasma membrane progesterone receptor and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 54: 993-1001
- Saling, PM and Storey, BT** (1979) Mouse gamete interactions during fertilization in vitro acrosome reaction in mouse sperm. *J. Cell Biology*, 83: 544-555
- Sanz, L, Calvete, JJ, Mann, K, Gabius, HJ, and Töpfer-Petersen, E** (1993) Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol. Reprod. and Develop.*, 35: 37-43
- Stryer, L** (1991) *Biochemie*. 5., völlig neu überarbeitete Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, New York,
- Suarez, SS** (1996) Hyperactivated motility in sperm. *J. of Andrology*, 17 (4): 331-335
- Suarez, SS and Dai, X** (1995) Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome-reacted hamster sperm. *Mol. Reprod. and Develop.*, 42: 325-333
- Summers, PM, Wennink, CJ, and Hodges, JK** (1985) Cloprostenol-induced luteolysis in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J. Reprod. Fertil.*, 73(1): 133-138
- Talbot, P and Chacon, RS** (1981) Observations on the acrosome reaction of human sperm in vitro. *Am. J. of Primatology*, 1: 211-219

- Talbot, P, Summers, RG, Hylander, BL, Keough, EM, and Franklin, LE** (1976) The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophor A23187. *J. Exp. Zool.*, 198 (3): 383-392
- Tanphaichitr, N, Agulnick, A, Seibel, M, and Taymor, M** (1988) Comparison of the in vitro fertilization rate bey human sperm capacitated by multiple-tube swim up and by Percoll gradient centrifugation. *J. of in vitro fertilization and embryo transfer*, 5 (3): 119-122
- Tarin, JJ and Trounson, AO** (1994) Inducers of the Acrosome Reaction. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6: 33-36
- Tash, JS and Bracho, GE** (1998) Identification of phosphoproteins coupled to initiation of motility in live epididymal mouse sperm. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 251: 557-563
- Tesarik, J, Carreras, A, and Mendoza, C** (1993) Differential sensitivity of progesterone- and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin. *Mol. Reprod. and Develop.*, 34: 183-189
- Tesarik, J, Moos, J, and Mendoza, C** (1993) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology*, 133: 328-335
- Thaler, CD and Cardullo, RA** (1995) The mammalian sperm surface: molecular and cellular aspects. In: Grudzinskas, JG and Yovich, JL: *Gametes - The spermatozoon*, Cambridge University Press: 20-45
- Thomas, P and Meizel, S** (1988) An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Res.*, 20: 397-411
- Thomas, P and Meizel, S** (1989) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimualted with follicular fluid or progesterone is dependent upon  $Ca^{2+}$  influx. *Biochem. J.*, 264: 539-546
- Tollner, TL, Overstreet, JW, and Vandevort, CA** (1995) Effect of Protein Kinase C stimulators on Zona pellucida binding and the acrosome reaction of Macaque Sperm. *Biology of Reproduction*, 52: 1418-1425
- Tomes, CN, Carballada, R, Moses, DF, Katz, DF, and Saling, PM** (1998) Treatment of human spermatozoa with seminal plasma inhibits protein tyrosine phosphorylation. *Mol. Human Reproduction*, 4 (1): 17-25
- Topper, EK, Killian, GJ, Way, A, Engel, B, and Woelders, H** (1999) Influence of capacitation and fluids from th male and female genital tract on the zona binding ability of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 115: 175-183
- Uto, N and Yamahama, Y** (1996) The motility and fertility of golden hamster sperm cultured in BSA-free medium. *Biol. Cell*, 88 (1-2): 23-28
- Vandevort, CA and Overstreet, JW** (1995) Effects of Glucose and other energy substrates on the hyperactivated motility of macaque sperm and the Zona pellucida-induced acrosome

- reaction. *J. of Andrology*, 16 (4): 327-333
- VandeVoort, CA and Overstreet, JW** (1996) Macaque sperm fusion with zona-free hamster oocytes. *J. Med. Primatol.*, 25: 356-360
- VandeVoort, CA, Tollner, TL, and Overstreet, JW** (1994) Separate effects of caffeine and dbcAMP on Macaque sperm motility and interaction with the Zona pellucida. *Mol. Reprod. and Develop.*, 37: 299-304
- VandeVoort, CA, Tollner, TL, and Overstreet, JW** (1992) Sperm-Zona pellucida interaction in cynomolgus and rhesus macaques. *J. of Andrology*, 13 (5): 428-432
- VandeVoort, CA, Yudin, AI, and Overstreet, JW** (1997) Interaction of acrosome-reacted macaque sperm with the macaque Zona pellucida. *Biology of Reproduction*, 56: 1307-1316
- Visconti, PE, Bailey, JL, Moore, GD, Pan, D, Olds-Clarke, P, and Kopf, GS** (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121: 1129-1137
- Visconti, PE, Galantino-Homer, H, Moore, GD, Bailey, JL, Ning, X, Fornes, M and Kopf, GS** (1998) The molecular basis of sperm capacitation. *J. of Andrology*, 19 (2): 242-248
- Visconti, PE and Kopf, GS** (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 59: 1-6
- Visconti, PE, Moore, GD, Bailey, JL, Leclerc, P, Connors, SA, Pan, D, Olds-Clarke, P, and Kopf, GS** (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121: 1139-1150
- Visconti, PE, Stewart-Savage, J, Blasco, A, Battaglia, L, Miranda, P, Kopf, GS, and Tezon, JG** (1999) Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biology of Reproduction*, 61: 76-84
- Ward, CR and Storey, BT** (1984) Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Developmental Biology*, 104: 287-296
- WHO handbook** (1995) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4. edn. Cambridge: Cambridge University Press
- Wilton, LJ, Marshall, VS, Piercy, EC, and Moore, HDM** (1993) *In vitro* fertilization and embryo development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J. Reprod. Fertil.*, 97: 481-486
- Yanagimachi, R** (1994) Mammalian fertilization. Chapter 5. In: Knobil, E, Neill, JD, Euing, LL, Markert, CI, Greenwald, GS, Paff, DN. *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, Ltd., New York: 189-317
- Yanagimachi, R, Lopata, A, Odom, CB, Bronson, RA, Mahi, CA, and Nicolson, GL** (1979)



Retention of biological characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 31 (5): 562-574

**Yanagimachi, R and Usui, N** (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell. Research*, 89: 161-174

**Yeoman, RR, Sonksen, J, Gibson, SV, Rizk, BM, and Abee, CR** (1998) Penile vibratory stimulation yields increased spermatozoa and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in a neurological intact primate (*Saimiri boliviensis*). *Human Reproduction*, 13 (9): 2527-2531

**Yeung, CH, Cooper, TG, and Weinbauer, GF** (1996) Maturation of monkey spermatozoa in the epididymis with respect to their ability to undergo the acrosome reaction. *J. of Andrology*, 17: 427-432

**Yeung, CH, Majumder, GC, Behre, HM, and Cooper, TG** (1996) The role of phosphocreatine kinase in the motility of human spermatozoa supported by different metabolic substrates. *Mol. Human Reproduction*, 2 (8): 591-596

**Yeung, CH, Morrell, JM, Cooper, TG, Weinbauer, GF, Hodges, JK, and Nieschlag, E** (1996) Maturation of sperm motility in the epididymis of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Int. J. of Andrology*, 19: 113-121

**Yeung, CH, Weinbauer, GF, and Cooper, TG** (1999) Responses of monkey epididymal sperm of different maturational status to second messengers mediating protein tyrosine phosphorylation, acrosome reaction, and motility. *Mol. Reprod. and Develop.*, 54: 194-202

## Anhang

### 1. Rezepte

#### 1.1. pNaCl (pH 7,4)

Lsg.A: 179 g/1Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 12 H<sub>2</sub>O

Lsg.B: 69 g/1NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O

Phosphatpuffer: 20 ml Lsg.A + 5 ml Lsg.B + 75 ml H<sub>2</sub>O

pNaCl: 100 ml 0,9 %ig NaCl + 50 ml Phosphatpuffer

#### 1.2. modifiziertes Tyrode's Albumin Laktat Pyruvat (TALP) Medium

Chemikalie	Konzentration	g/l
NaCl	127,00 mM	7,420
KCl	3,16 mM	0,236
NaHCO <sub>3</sub>	2,00 mM	0,168
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,35 mM	0,048
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,50 mM	0,100
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	2,00 mM	0,294
HEPES (Na-Salt)	5,00 mM	1,302
HEPES (Acid)	5,00 mM	1,192
Glucose	5,00 mM	0,901
Na-Laktat	10,0 mM	1860,0 µl
Phenolrot		1,0
aqua bidest		1000 ml

pH 7,3

Osmolarität: 290 ± 5 mOsmol

#### Zusatz vor Gebrauch:

3,00 mg/ml BSA (Fraktion V)

0,25 mM Na-Pyruvat

10,00 mM HEPES

#### 1.3. swelling solution

0,735 g Na-Citrat

1,251 g Fruktose

in 100 ml bH<sub>2</sub>O lösen

#### 1.4. Salzlösung für Oocytenlagerung

1,5 M MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O

0,1 % PVP

40 mM HEPES

pH = 7,4 (einstellen mit 0,3 M NaOH)

## **1.5. Detektion der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung**

### **1.5.1 Probenpuffer nach Laemmli**

0.0625 M	Tris-HCl (pH 6.8)
2 %	SDS
0.1 M	Mercaptoethanol
10 %	Glycerol
0.01 %	Bromphenolblau

### **1.5.2 Trenngel-Puffer**

3 M	TRIS (pH 8.8)
-----	---------------

in bH<sub>2</sub>O lösen, mit konzentrierter HCl pH 8.8 einstellen  
durch Whatmann Nr. 1 filtrieren und bei 4°C aufbewahren

### **1.5.3 Sammelgelpuffer**

0,5 M	TRIS (pH 6.8)
-------	---------------

in bH<sub>2</sub>O lösen, mit konzentrierter HCl pH 6.8 einstellen  
durch Whatmann Nr. 1 filtrieren und bei 4°C aufbewahren

### **1.5.4 Kammerpuffer**

0.25 M	TRIS (pH 8.3)
1.92 M	Glycin
1%	SDS

in bH<sub>2</sub>O lösen; bei 4°C lagern  
vor Gebrauch 1:10 in bH<sub>2</sub>O verdünnen

### **1.5.5 Coomassie Färbelösung**

40 %	Methanol
10 %	Eisessig
0,035 %	Coomassie Brilliant Blue (R-250)

in bH<sub>2</sub>O

### **Entfärbelösung**

40 %	Methanol
10 %	Eisessig

in bH<sub>2</sub>O

### 1.5.6 Transferpuffer

48 mM Tris  
1,3 mM SDS

in bH<sub>2</sub>O lösen,

pH auf 9.2 mit Glycin einstellen

20 % Methanol

auf Endvolumen mit bH<sub>2</sub>O auffüllen und bei 5°C lagern.

### 1.5.7 Ponceau S - Färbelösung

0,2 % Ponceau S

3.0 % Trichloressigsäure (TCA)

in bH<sub>2</sub>O lösen

Lagerung: bei RT ca. 1 Jahr haltbar

### 1.5.8 Blocklösung1

#### 5 x PBS

0,5 M NaCl

0,4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

in bH<sub>2</sub>O lösen; pH 7.5 einstellen und auf Endvolumen auffüllen

#### *Blocking solution 1:*

20 % 5 x PBS

0.05 % Tween 20

1 % Casein

20% FCS

in bH<sub>2</sub>O

### 1.5.9 Blocklösung2

20 % 5 x PBS

0.05 % Tween 20

in bH<sub>2</sub>O

### 1.5.10 Waschpuffer

20 % 5 x PBS

0.05 % Tween 20

1 % Triton X-100

10% SDS

in bH<sub>2</sub>O

### 1.5.11 TTBS-Puffer (nach Visconti et al., 1995)

25 mM	Tris, pH 7,5
150 mM	NaCl
0,1 %	Twenn 20

## 2. Chemikalien und Verbrauchsmittel

### Antikörper

#### Anti-Phosphotyrosin

(mouse monoclonal IgG<sub>2bk</sub>) upstate biotechnology05-321

Anti-mouse IgG, HRP-konjugiert upstate biotechnology12-349

#### Anti-Progesteronrezeptor

(mouse monoclonal IgG) DIANOVA PR 1808

Ziege-anti-mouse IgG, FITC-konjugiert Immunotech

### Chemikalien (alphabetisch)

Acrylamid Stammlösung	ROTH	3029.1
Ammoniumpersulfat (AMPS)	Pharmacia Biotech	17-1311-01
BAPTA/AM	CALBIOCHEM	196419
(1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)		
Bovine serum albumin (BSA), Fraktion V	SIGMA	A 3311
Bromphenolblau	MERCK	8122
Caffeine	SIGMA	C 0750
Calciumionophor A23187	SIGMA	C 7522
Casein	SIGMA	C 5890
Citifluor® AF2	Plano, Cappel	
Coomasie Brilliant Blue (R-250)	ROTH	3862.1
dbcAMP	SIGMA	D 0627
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA	D 8779
EGTA	SIGMA	E 4378
(Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)- N,N,N',N'-tetraacetic acid)		
Eisessig (acetic acid)	JT Baker	6052
Eosin B	SIGMA	E 8761
Ethanol	ROTH	9065.2
Fruktose	BDH	10 367
Glukose	BDH	10117
Glycerol	BDH	28454
Glycin	ROTH	3790.1
HCl	JT Baker	7038
Heparin	SIGMA	H 3149

HEPES (acid)	Calbiochem	391 338
HEPES (salt)	SIGMA	H 8651
Hoechst H33258	SIGMA	B 2883
Kaliumchlorid (KCl)	BDH	10198
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O)	BDH	10149
Mercaptoethanol	SIGMA	M 6250
Methanol	ROTH	7342.1
Natriumchlorid (NaCl)	BDH	10241
Natriumcitrat	SIGMA	S 4641
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	MERCK	6346
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	BDH	10247
Natrium-Laktat	SIGMA	L 1375
Natrium-Pyruvat	SIGMA	S 2256
Paraformaldehyd	SIGMA	P 6148
Percoll	SIGMA	P 1644
Phenolrot	GIBCO	11160-058
Phosphotyrosin-Positivkontrolle	BIOMOL	54295
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	SIGMA	PVP-40
Ponceau S	MERCK	1.14275
Prestained molecular weight standard	SIGMA	SDS-7B
Progesteron (4-Pregnene-,3,20-dione)	SIGMA	P 0130
Propidiumjodid	SIGMA	P 4170
PSA-FITC	SIGMA	L 0770
(Pisum sativum agglutinin, FITC labeled)		
Puresperm	Nidacn	
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	ROTH	2326.2
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	MERCK	3029.1
Tris	SIGMA	T 1503
Tris-HCl	SIGMA	T 3253
Triton X-100	SERVA	37238
Tween 20	MERCK	822184

#### verschiedenes

Enhanced chemolumineszenz (ECL)	AMERSHAM	RPN 2109
Entwickler „LX 24“	Kodak	
Filterpapier	Schleicher&Schüll	
Fixierer „Polymax“	Kodak	
NylonMembran „Hybond C“	AMERSHAM	RPN 203C
Röntgenfilm „X-OMAT“	Kodak	165 1512

### 3. Tiere

#### 3.1 Tierübersicht *vaginal washing*

Tiername	Id-Nr.	geb.	Herkunft	Reprostatus	Abkürzungen
Vroni	5931	04.08.89	ciba-geigy	ov 31.01.93	V
Kerstin	6727	08.11.91	Berlin	ov 24.05.96	K
Raissa	6725	12.09.91	Berlin	ov 10.02.95	R
Henna	6676	15.08.93	DPZ	ov 09.09.97	H
Almuth	5668	13.09.90	Berlin	ov 10.11.97	A
Katharina	6736	27.06.88	Berlin	ov (Datum?)	Kt
Hexe	9398	25.08.96	DPZ	intakt	Hx
Ortrud	6678	16.08.93	DPZ	ov 04.06.97	O
Martin	6203	31.06.90	Wuppertal	unbekannt	Mt
Kevin	6726	11.08.91	Berlin	Kinder	Kv
Tristan	5609	20.02.90	Düsseld.	Kinder	Tr
Artus	7135	14.06.94	DPZ	Kinder	Ar
Vancouver	6812	20.11.93	DPZ	keine Kinder	Vc
Dr.Doolittle	6733	14.09.88	Berlin	Ki. m. 6732	DD
Sergej	6724	21.07.91	Berlin	Kinder	Se
Hauptmann	6729	06.08.91	Berlin	Kinder	Hp
Amigo	5882	25.01.90	Zürich	Kinder	Ag
Manzoor	6399	08.12.92	DPZ	Kinder	Mz
Gabriel	6737	29.07.88	Berlin	Kinder	Gb
Montgomery	5886	04.09.91	DPZ	Kinder	Mn

#### 3.2 Tierübersicht *penile Vibrostimulation*

Tiername	Id-Nr.	geb.	Herkunft	Reprostatus	Abkürzungen
Artus	7135	14.06.94	DPZ	Kinder	Ar
Dr.Doolittle	6733	14.09.88	Berlin	Ki. m. 6732	DD
Sergej	6724	21.07.91	Berlin	Kinder	Se
Hinnei	6133	01.04.92	DPZ	Kinder	
Snoopy	7046	08.05.94	DPZ	keine Kinder	
Lorenz	6521	23.03.93	DPZ	keine Kinder	
Bootsmann	7039	10.05.94	DPZ	Kinder	
Donald	6822	28.11.93	DPZ	Kinder	
Tristan	5609	20.02.90	Düsseldorf	Kinder	

### 3.3 Tierübersicht Kastration

<b>Tiername</b>	<b>Id-Nr.</b>	<b>geb.</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Reprostatus</b>	<b>Abkürzungen</b>
Vacek	5522	06.06.89	München	Kinder	
Esel	5526	26.05.89	München	Kinder	
Horizont	5530	09.03.89	München	Kinder	
Sebastian	6735	04.06.90	Berlin	Kinder	
Action	7711	03.07.95	DPZ	keine Kinder	
Babalou	8586	03.02.97	DPZ	keine Kinder	
Vermont	6812	20.11.93	DPZ	Kinder	
Vancouver	6813	20.11.93	DPZ	keine Kinder	