



Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Institut 1: Zelluläre Signalverarbeitung

***Chemotaxis von Seeigel-Spermien:
Kinetische Messungen
intrazellulärer Botenstoffe***

Johannes Solzin

***Chemotaxis von Seeigel-Spermien:
Kinetische Messungen
intrazellulärer Botenstoffe***

Johannes Solzin

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4030

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung

Institut1: Zelluläre Signalverarbeitung Jül-4030

D38 (Diss., Köln, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Kurzzusammenfassung

Das Eizell-Peptid Resact wirkt chemotaktisch auf Spermien des Seeigels *Arbacia punctulata*. Resact bindet an eine membranständige Rezeptor-Guanylylzyklase auf dem Spermienflagellum und aktiviert so eine Signalkaskade. Dies führt dazu, dass in dem Spermium u.a. die cGMP-/cAMP-Konzentration, die Ca^{2+} -Konzentration, sowie der pH-Wert ansteigen. Die zeitliche Abfolge und damit die kausalen Zusammenhänge der einzelnen physiologischen Reaktionen waren bisher unbekannt. Aus diesem Grund verwendete ich die *Quenched-Flow*- und die *Stopped-Flow*-Methode um die einzelnen Reaktionen zeitlich aufgelöst – d.h. im Millisekunden-Maßstab – zu messen. Durch diese Methoden war es erstmals möglich die zeitliche Abfolge der einzelnen Reaktionen zu bestimmen.

Die Messungen zeigen, dass hohe Resact-Konzentrationen einen extrem schnellen und großen Anstieg der cGMP-Konzentration induzieren. Die cGMP-Konzentration steigt innerhalb der ersten 25 ms an und erreicht ihren halbmaximalen Wert schon nach ca. 200 ms. Während schon picomolare Resact-Konzentrationen einen Anstieg der cGMP-Konzentration auslösen, steigt die cAMP-Konzentration erst bei nanomolaren Resact-Konzentrationen an. Der cAMP-Anstieg ist, verglichen mit dem cGMP-Anstieg, wesentlich kleiner und langsamer.

Ungefähr 250 ms nach der Resact-Stimulation beginnt der Ca^{2+} -Einstrom. Dieser besteht aus einem „frühen“ und einem „späten“ Ca^{2+} -Signal. Das frühe Ca^{2+} -Signal kann schon durch einzelne Resact-Moleküle ausgelöst werden. Im Gegenteil zum späten Ca^{2+} -Signal, findet das frühe Ca^{2+} -Signal zeitgleich mit der Resact-induzierten Änderung der Schwimmverhaltens statt. Das frühe Ca^{2+} -Signal stellt daher die zentrale Reaktion in der Resact-induzierten Signalkaskade dar. Experimente mit *caged*-cGMP bzw. *caged*-cAMP zeigen, dass das frühe Ca^{2+} -Signal durch den cGMP-Anstieg ausgelöst wird: Der cGMP-induzierte Ca^{2+} -Einstrom ist dem frühen Ca^{2+} -Signal sehr ähnlich, der cAMP-induzierte Ca^{2+} -Einstrom nicht. Sowohl das späte Ca^{2+} -Signal als auch der cAMP-Anstieg werden nur durch hohe Resact-Konzentrationen ausgelöst und sind – zumindest in Gegenwart von IBMX – langsamer als das frühe Ca^{2+} -Signal. Dies deutet darauf hin, dass der cAMP-Anstieg den späten Ca^{2+} -Einstrom auslöst. An Hand der *lag*-Zeit des Ca^{2+} -Einstroms konnte man erkennen, dass weder cGMP noch cAMP direkt einen Ca^{2+} -Kanal öffnen. Über welchen Mechanismus der Ca^{2+} -Einstrom erfolgt, ist unbekannt.

Das pH-Signal reagiert, wie das Ca^{2+} -Signal, auf Resact-Konzentrationen über mehr als 6 Größenordnungen. Die *lag*-Zeit des pH-Signals ist nur bei hohen Resact-Konzentrationen kürzer als die des Ca^{2+} -Signals. Bei niedrigen Resact-Konzentrationen beginnt das pH-Signal

nach dem frühen Ca^{2+} -Einstrom. Dieses Ergebnis zeigt, dass der pH-Anstieg nicht den Ca^{2+} -Einstrom aktiviert.

Des Weiteren wurde mit der *Quenched-Flow*-Methode gezeigt, dass das Eizellpeptid Asterosap in *Asterias amurensis*-Spermien einen extrem schnellen und großen Anstieg der cGMP-Konzentration auslöst, während es zu keinem cAMP-Anstieg kommt. Diese Messungen unterstützen andere Messungen, die zeigten, dass der Rezeptor für Asterosap – wie der Resact-Rezeptor – eine GC ist.

Abstract

The egg-petide resact induces a chemotactical response of sperm from sea urchin *Arbacia punctulata*. By binding to a receptor-guanylylcyclase on the flagellar membrane resact activates a signaling-cascade. This leads to an increase in cGMP-/cAMP-concentration, Ca^{2+} -concentration and pH. The sequence and thereby the causal relations of the single physiological reactions were unknown before. In order to reveal the sequence of the signaling events I have established two methods which allowed time-resolved measurements (e.g. in millisecond time-scale) of the physiological reactions. The quenched-flow-method was used to detect the time-course of the cGMP-/cAMP-concentration. Therefore it was combined with cGMP-/cAMP-sensitive Radioimmunoassays. The stopped-flow-method was used to record the time-course of the Ca^{2+} - or pH-sensitive fluorescence-indicators. Both methods enabled me to measure for the first time the sequence of the physiological reactions.

The measurements showed, that resact induces a fast and high increase of the cGMP-concentration. The cGMP-concentration starts rising within the first 25 ms and reaches its half-maximal concentration within 200 ms. A cGMP-increase is already induced at picomolar resact-concentrations whereas a cAMP-increase is only induced by nanomolar resact-concentrations. Furthermore the cAMP-increase is slighter and slower compared to the cGMP-increase.

Around 250 ms after the stimulation with resact the Ca^{2+} -concentration increases. This Ca^{2+} -signal can be divided in an „early“ and a „late“ Ca^{2+} -signal. While the early Ca^{2+} -signal can be already triggered by single resact-molecules the late Ca^{2+} -signal is less sensitive to the egg-petide. The early Ca^{2+} -signal is either directly or through other signaling events triggered by cGMP. The cAMP-increase is – at least in the presence of the PDE-inhibitor IBMX – slower than the late Ca^{2+} -signal. Thereby cAMP could only trigger the late Ca^{2+} -signal. In contrast to the late Ca^{2+} -signal the early Ca^{2+} -signal is induced at the same time as the resact-induced change of the swimming-behavior. Thus the early Ca^{2+} -signal represents the crucial reaction in the resact-induced signaling-cascade.

Like the early Ca^{2+} -signal, the pH responds to resact-concentrations over more than 6 orders of magnitude. The delay of the pH-change is only at high resact-concentrations faster than the delay of the Ca^{2+} -signal. At low resact-concentrations the pH increases after the Ca^{2+} -concentration. Contrary to other publications, this result shows that the pH-increase does not trigger the Ca^{2+} -increase.

Quenched-flow-measurements on sperm of the starfish *Asterias amurensis* showed that the egg-peptide asterosap induces an extremely fast and high cGMP-increase, whereas no change in cAMP-concentration can be measured. These results supports the ideas that the receptor of asterosap is – like the resact-receptor – a guanylylcyclase and that cAMP seems to be unimportant for fast chemotactical responses.

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung	1
1.1	Stadien der Eizellbefruchtung	1
1.2	Chemotaxis von Seeigel-Spermien	2
1.3	Zielsetzung	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Chemikalien	9
2.1.2	Optische Filter	9
2.1.3	Lösungen	9
2.2	Methoden	10
2.2.1	Haltung der Seeigel	10
2.2.2	Entnahme der Spermien	10
2.2.3	Vitalitätsbestimmung der Spermien	11
2.2.4	Beladung der Seeigel-Spermien mit Ca^{2+} -, pH-Indikatoren und <i>caged</i> zyklischen Nukleotiden	11
2.2.4.1	Ca^{2+} -Indikator	11
2.2.4.2	pH-Indikator	11
2.2.4.3	<i>caged</i> -zyklische Nukleotide	12
2.2.5	Prinzip der <i>Stopped</i> - und <i>Quenched-Flow</i> -Messungen	12
2.2.5.1	Aufbau der <i>Stopped-Flow</i> -Apparatur	13
2.2.5.2	Aufbau der Anlage für Fluoreszenzmessungen	14
2.2.5.3	Durchführung der Fluoreszenzmessungen	16
2.2.6.1	Aufbau der Anlage für <i>Quenched-Flow</i> -Messungen	18
2.2.6.2	Durchführung der <i>Quenched-Flow</i> -Messungen	18
2.2.6.3	Auswertung der <i>Quenched-Flow</i> -Proben	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Optimierung der Methoden	21
3.1.1	<i>Quenched-Flow</i> -Methode	21
3.1.1.1	Werden die Spermien durch den Mischvorgang geschädigt?	21

3.1.1.2	Wird die cNMP-Ruhekonzentration durch den Mischvorgang verändert?	22
3.1.1.3	Verändert sich die cNMP-Ruhekonzentration während eines Experiments?	23
3.1.1.4	Wie lassen sich SAP-Kontaminationen entfernen?	24
3.1.2	<i>Stopped-Flow</i> -Messungen	26
3.1.2.1	Ca ²⁺ -Messungen	26
3.1.2.1.1	Beschreibung des Resact-induzierten Ca ²⁺ -Signals	26
3.1.2.1.2	Das Resact-induzierte Fluoreszenzsignal zeigt eine Änderung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration an	29
3.1.2.1.3	Werden die Messsignale durch den Mischvorgang beeinträchtigt?	31
3.1.2.1.4	Welchen Einfluss hat die Beladungsdauer mit Fluo-4 auf die Form des Ca ²⁺ -Signals?	32
3.1.2.1.5	Welcher Puffer ist am besten für die Beladung der Spermien mit Fluo-4 geeignet?	34
3.1.2.1.6	Ist es notwendig den extrazellulären Indikator nach der Beladung zu entfernen?	36
3.1.2.1.7	Ändert sich die Form des Ca ²⁺ -Signals während eines Experiments?	38
3.1.2.1.8	Ändern sich Form und Amplitude der Ca ²⁺ -Signale im Laufe der Laichzeit?	40
3.1.2.1.9	Wie reproduzierbar sind hintereinander gemessene Ca ²⁺ -Signale?	41
3.1.2.2	pH-Messungen	42
3.1.2.2.1	Beschreibung des Resact-induzierten pH-Signals	42
3.1.2.2.2	Das Resact-induzierte Fluoreszenzsignal zeigt eine Änderung des pH-Werts an	44
3.1.2.2.3	Wie schnell reichert sich BCECF während der Beladung in den Spermien an?	46
3.1.2.2.4	Werden die pH-Signale durch den Mischvorgang beeinträchtigt?	47
3.1.2.2.5	Ändern sich Form und Amplitude des pH-Signals während eines Experiments bzw. im Lauf der Laichzeit?	48
3.1.2.2.6	Wie reproduzierbar sind hintereinander gemessene pH-Signale?	50
3.2	Zeitverlauf der SAP-induzierten Reaktionen	52

3.2.1	Resact-induzierte Änderungen der cNMP-Konzentration in <i>A. punctulata</i>-Spermien	52
3.2.1.1	Resact induziert einen schnellen, transienten Anstieg der cGMP-Konzentration	52
3.2.1.2	Der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX verhindert die Abnahme der Resact-induzierten cGMP-Konzentration	54
3.2.1.3	Der Resact-induzierte cAMP-Anstieg ist langsamer und kleiner als der cGMP-Anstieg	57
3.2.1.4	IBMX verlangsamt den Resact-induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration	61
3.2.1.5	Asterosap-induzierte Änderung der cNMP-Konzentration in <i>Asterias amurensis</i> -Spermien	63
3.2.1.5.1	Asterosap induziert einen großen, schnellen cGMP-Anstieg	63
3.2.2	Kinetische Messungen der Resact-induzierten Änderung der Ca^{2+}-Konzentration	69
3.2.2.1	Resact induziert einen „frühen“ und einen „späten“ Ca^{2+} -Einstrom	69
3.2.2.2	IBMX verhindert den Rückgang des Ca^{2+} -Einstroms	72
3.2.2.3	Spermien reagieren auf einzelne Resact-Moleküle	75
3.2.2.4	<i>Caged</i> -zyklische Nukleotide	78
3.2.2.4.1	BECMCM- <i>caged</i> -cNMP	79
3.2.2.4.2	Der cGMP-induzierte und der Resact-induzierte Ca^{2+} -Einstrom sind sehr ähnlich	81
3.2.2.5	<i>Caged</i> -Resact	85
3.2.3	Kinetische Messungen der Resact-induzierten Änderung des pH-Werts	88
3.2.3.1	Abhängigkeit des pH-Signals von der Resact-Konzentration	88
3.2.3.2	Das Resact-induzierte pH-Signal löst nicht den Ca^{2+} -Einstrom aus	91
3.2.4	Pharmakologie der Ca^{2+} -Signale	93
3.2.4.1	Wird das Ca^{2+} -Signal durch K^{+} -Kanalblocker unterdrückt?	93
3.2.4.2	Ist der SPIH-Kanal an der Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms beteiligt?	94
3.2.4.3	Welcher Ca^{2+} -Kanal ist an dem Signalweg beteiligt?	95
3.2.4.4	Regulieren Proteinkinasen den Ca^{2+} -Einstrom?	96
4	Diskussion	99
4.1	Wozu sind zeitlich aufgelöste Messungen an intakten Spermien	99

	notwendig?	
4.2	Optimierung und Probleme der Messmethode	100
4.2.1	Beladung der Spermien mit Fluoreszenzindikatoren	100
4.2.2	Kalibrierung der Ca^{2+} -Konzentration bzw. des pH-Werts	101
4.3	Ablauf der Resact-induzierte Reaktionen in <i>Arbacia punctulata</i> -Spermien	102
4.4	Asterosap-induzierte Änderung der cGMP-Konzentration in <i>Asterias-amurensis</i> -Spermien	110
4.5	Zusammenfassung	112
5	Ausblick	114
6	Literaturverzeichnis	115

II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AM-Ester	Acetomethoxy-Ester
ASW	künstliches Seewasser (<i>artificial seawater</i>)
BAPTA	1,2-Bis (2-aminophenoxy)-ethan-N-N-N'-N'-tetraessigsäure
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
CNG-Kanal	zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (<i>cyclic nucleotide-gated</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
FCCP	Carbonyl-cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
g	Gramm bzw. Normal-Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
h	Stunde(n)
HCN-Kanal	<i>Hyperpolarisation-and-Cyclic-Nucleotide-gated</i> -Kanal
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HEPPS	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-3-propansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
K _D	Dissoziationskonstante
M	Molar
min	Minute(n)
ms	Millisekunde
μl	Mikroliter
μs	Mikrosekunde
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SFM	<i>Stopped-Flow</i> -Apparatur
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethylammonium
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Spannung in Volt

VIS	sichtbar
Vol.	Volumen
4-AP	4-Aminopyridin

1 Einleitung

1.1 Stadien der Eizellbefruchtung

Ein neuer Organismus entsteht bei höheren Lebewesen aus der Vereinigung von Spermium und Eizelle. Die Eibefruchtung setzt eine Reihe spezifischer Wechselwirkungen zwischen Spermium und Eizelle voraus (Abb. 1.1).

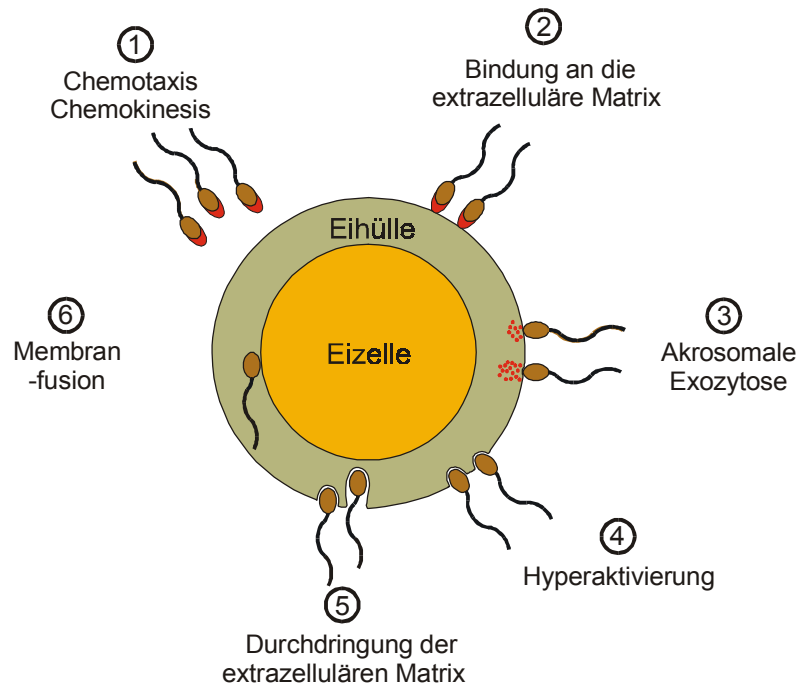


Abb. 1.1: Stadien der Eibefruchtung. Dargestellt sind die verschiedenen Interaktionen zwischen Spermium und Eizelle (Einzelheiten siehe Text).

Zunächst „kommunizieren“ Eizelle und Spermium miteinander mit Hilfe von Faktoren, die die Eizelle freisetzt (zur Übersicht: Harper, 1994). Diese Faktoren steuern das Schwimmverhalten der Spermien: sie kontrollieren sowohl die Richtung, in die das Spermium schwimmt (Chemotaxis), als auch die Schwimgeschwindigkeit (Chemokinesis). Chemotaxis ist für Spermien von marinen Invertebraten gut belegt (Cosson, 1990). In den vergangenen Jahren häufen sich auch die Hinweise auf chemotaktisch wirksame Faktoren bei Säuger-Spermien (Villanueva-Diaz *et al.*, 1990, 1992; Ralt *et al.*, 1991, 1994; Cohen-Dayag *et al.*, 1994, 1995; Giojalas *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2001). Nachdem das Spermium die Eizelle erreicht hat, bindet es an deren extrazelluläre Glykoproteinmatrix. Nach der Bindung erfolgt die akrosomale Exozytose, die große Mengen verschiedener Proteasen

und anderer hydrolytisch aktiver Enzyme freisetzt. Diese Enzyme helfen dem Spermium, gemeinsam mit einer gesteigerten Schlagfrequenz des Spermischwanzes (Hyperaktivierung), die Glykoproteinmatrix zu durchdringen. In einem weiteren Schritt verschmelzen die Plasmamembranen von Spermium und Eizelle und schließlich fusionieren die beiden Zellkerne. Im Rahmen dieser Doktorarbeit beschäftigte ich mich mit den Mechanismen, die das chemotaktische Schwimmverhalten von Seeigel- und Seestern-Spermien steuern.

1.2 Chemotaxis von Seeigel-Spermien

Anfang des letzten Jahrhunderts beobachtete Lillie (1913), dass wasserlösliche Stoffe, die von der Eizelle stammen, das Bewegungsmuster von Seeigel-Spermien verändern. Bis heute sind mehr als 70 verschiedene Eizellstoffe bekannt, vornehmlich von Seeiegeln und Seesternen (Suzuki, 1995). Diese Eizellstoffe wurden als Peptide identifiziert, die artspezifisch wirken (Hansbrough & Garbers, 1981a; Suzuki *et al.*, 1981, 1995). Binden die SAPs (sperm activating pptides) an einen spezifischen Rezeptor, so lösen sie verschiedene zelluläre Reaktionen aus (Abb. 1.2). Sowohl die cGMP- und cAMP-Konzentration als auch der pH-Wert steigen an. Es kommt zu einem K^+ -Ausstrom und zu einem Ca^{2+} -Einstrom, wodurch sich das Membranpotential ändert. Außerdem werden Proteine phosphoryliert und dephosphoryliert. Diese zellulären Reaktionen steuern nicht nur Chemotaxis und Motilität der Spermien, sondern auch Zellatmung und akrosomale Exozytose (Abb. 1.2).

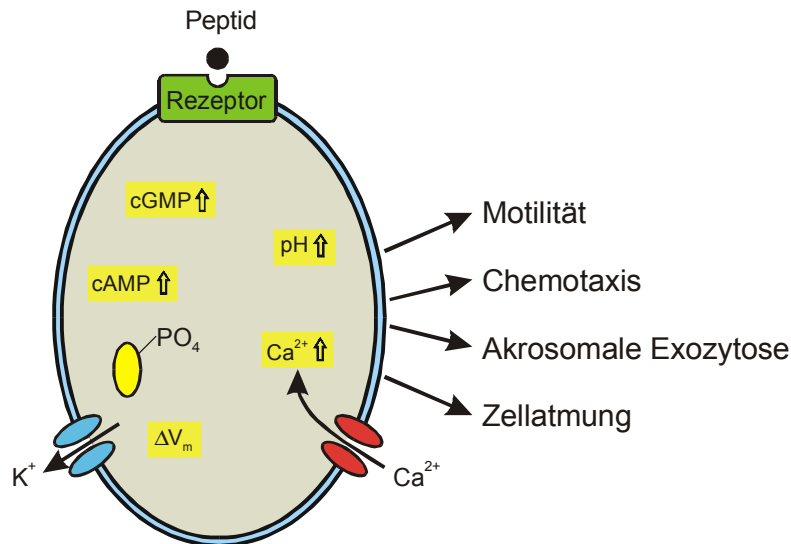


Abb. 1.2: Effekte von SAPs. Bindet ein SAP (sperm activating peptide) an seinen Rezeptor so wird ein Signalweg aktiviert. Die cGMP- und cAMP-Konzentration sowie der pH-Wert steigen an. Ebenfalls verändert sich der Phosphorylierungszustand bestimmter Proteine. Des Weiteren wird ein K⁺-Kanal geöffnet, was die Zelle hyperpolarisiert. Die Öffnung von Ca²⁺-Kanälen führt zu einem Ca²⁺-Einstrom und somit zu einer Depolarisation. Die zellulären Reaktionen steuern nicht nur Chemotaxis und Motilität der Spermien, sondern auch Zellatmung und akrosomale Exozytose.

Die SAPs unterscheiden sich in Größe und Struktur (zur Übersicht siehe Suzuki, 1995). Beispielsweise sind Resact und Speract kurze Peptide der Seeigel-Arten *Arbacia punctulata* bzw. *Strongylocentrotus purpuratus* (Suzuki *et al.*, 1981; Garbers *et al.*, 1982; Suzuki *et al.*, 1984). Während Speract eine lineare Struktur aufweist, bildet Resact mit Hilfe einer intramolekularen Disulfid-Brücke eine zirkuläre Struktur aus. Dagegen ist Asterosap, das SAP des Seesterns *Asterias amurensis*, größer als die beiden Peptide der Seeigel, weist jedoch ähnlich wie Resact eine zirkuläre Struktur auf (Yoshino *et al.*, 1991; Nishigaki *et al.*, 1996).

Für Asterosap konnte nachgewiesen werden, dass es sowohl die Schwimmggeschwindigkeit der Spermien erhöht als auch dass es die akrosomale Exozytose fördert (Nishigaki *et al.*, 1996). Eine chemotaktische Wirkung konnte bisher nicht gezeigt werden. Auch ist nichts über den Asterosap-aktivierten Signalweg bekannt. AM besten untersucht sind die Resact- und Speract-aktivierten Signalwege. Allerdings konnte bisher nur für Resact eine chemotaktische Wirksamkeit auf Spermien zweifelsfrei nachgewiesen werden (Ward *et al.*, 1985a), während für Speract bisher nur unter bestimmten *in vitro* Bedingungen gezeigt wurde, dass es das Bewegungsmuster verändert (Cook *et al.*, 1994). Des Weiteren soll

Speract jedoch auch die akrosomale Exozytose fördern (Yamaguchi *et al.*, 1988; Shimizu *et al.*, 1990).

Der Rezeptor für Resact ist eine membranständige Guanylylzyklase (GC) (Shimomura *et al.*, 1986b). Speract dagegen soll an ein 77 kDa Rezeptor-Protein binden, das mit einer GC assoziiert ist (Dangott & Garbers, 1984). Werden Spermien mit SAPs stimuliert, steigt die intrazelluläre cGMP-Konzentration an (Shimomura & Garbers, 1986a). Abb. 1.3 zeigt ein gängiges Modell des SAP-aktivierten Signalwegs.

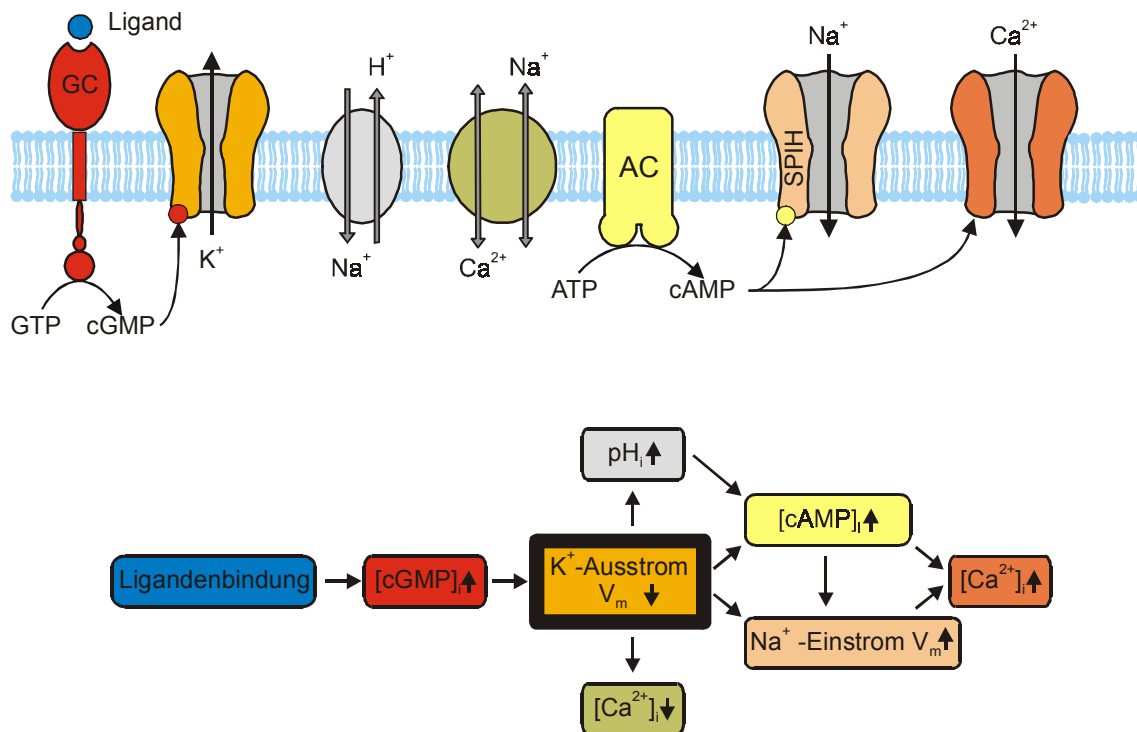


Abb. 1.3: Modell des SAP-aktivierten Signalwegs in Seeigel-Spermien.

Das SAP (Ligand) bindet an einen Rezeptor, bei dem es sich im Falle von Resact um eine membranständige Guanylylzyklase (GC) handelt. Die GC wird durch die Bindung des SAPs aktiviert, wodurch die intrazelluläre cGMP-Konzentration ansteigt. Dadurch öffnet ein cGMP-aktivierter K^+ -Kanal, wodurch das Spermium hyperpolarisiert. Die Hyperpolarisation aktiviert einen Na^+/H^+ -Austauscher, eine Adenylylzyklase und möglicherweise einen HCN-Kanal (SPIH). Dies führt jeweils zu einem Anstieg des pH-Werts, der cAMP-Konzentration und zu einer Depolarisation. Die Hyperpolarisation soll des Weiteren die Aktivität eines Na^+/Ca^{2+} -Austauschers verstärken, wodurch die Ca^{2+} -Konzentration sinkt. Der cAMP-Anstieg könnte einen Ca^{2+} -Kanal öffnen. Ebenso könnte die Depolarisation spannungsregulierte Ca^{2+} -Kanäle öffnen. (Einzelheiten siehe Text). (Modifiziertes Modell von Darszon *et al.*, 2001).

In *S. purpuratus*-Spermien konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit Speract (250 nM), die cGMP-Konzentration sehr schnell und deutlich ansteigt (Godde, 1996). Innerhalb von 0,2 s steigt die cGMP-Konzentration bis zum 30-fachen an. Anschließend fällt sie innerhalb von ~0,5 s auf ungefähr die Hälfte des maximalen Werts ab. Für diesen transienten Zeitverlauf sind Phosphodiesterasen (PDE) (Godde, 1996) und Phosphatasen (Garbers, 1989) verantwortlich. PDEs hydrolysieren cGMP; Phosphatasen dephosphorylieren die GC und inhibieren so die cGMP-Synthese (Suzuki *et al.*, 1984; Ramarao *et al.*, 1985; Bentley *et al.*, 1986).

SAPs sollen in Spermien eine Hyperpolarisation auslösen (Lee & Garbers, 1986; Babcock *et al.*, 1992; Cook *et al.*, 1993a; Galindo *et al.*, 2000), die durch einen cGMP-regulierten K^+ -Kanal vermittelt wird (Galindo *et al.*, 2000). Die Hyperpolarisation soll eine zentrale Reaktion in dem Signalweg sein. Sie soll einen Na^+/H^+ -Austauscher aktivieren, wodurch der pH-Wert ansteigt und es zu einem Na^+ -Einstrom kommt (Lee & Garbers, 1986). Sowohl der Anstieg des pH-Werts als auch die Hyperpolarisation sollen die Aktivität einer Adenylylzyklase (AC) regulieren (Beltran *et al.*, 1996; Cook & Babcock, 1993b). Godde (1996) zeigte an *S. purpuratus*-Spermien, dass die cAMP-Konzentration innerhalb von etwa 800 ms auf das 4-fache ansteigt. Verglichen mit dem cGMP-Anstieg ist der cAMP-Anstieg deutlich langsamer und geringer. Die Hyperpolarisation könnte auch einen Ionenkanal aus der HCN-Familie aktivieren (Gauss *et al.* 1998). Dieser sogenannte SPIH-Kanal wird durch cAMP (möglicherweise auch cGMP) moduliert. Zwar ist der SPIH-Kanal schwach K^+ -selektiv ($P_{Na}/P_K \approx 0,2$) (Kaupp & Seifert 2001), auf Grund der Ionenzusammensetzung des Seewassers und der relativen Permeabilitäten trägt der Kanal jedoch einen Na^+ -Einstrom. Eine Aktivierung des SPIH-Kanals depolarisiert die Zellmembran. Ein Kanal mit sehr ähnlichen Eigenschaften wie der SPIH wurde von Labarca und Mitarbeiter schon 1996 elektrophysiologisch charakterisiert. Die HCN-Kanalfamilie umfasst die Schrittmacher-Kanäle, die an der Erzeugung rhythmischer Aktivierungsmuster, z.B. im Herz oder in einzelnen Neuronen beteiligt sind (Kaupp & Seiffert, 2001). Der SPIH-Kanal ist im Flagellum der Spermien lokalisiert. Es könnte deshalb sein, dass dieser Kanal das Schlagmuster oder die Frequenz des Flagellenschlags moduliert und so an der Regulation des Schwimmverhaltens beteiligt ist.

Schackmann & Chock (1986) zeigten, dass Speract einen Ca^{2+} -Einstrom induziert. Ein Ca^{2+} -Einstrom ist für die Chemotaxis von *A. punctulata* essentiell (Ward *et al.*, 1985a): in Ca^{2+} -freiem Seewasser sind die Spermien zwar noch beweglich, zeigen aber keine Chemotaxis. Die

Mechanismen, die zu dem Ca^{2+} -Einstrom führen, werden kontrovers diskutiert: Erstens könnte die vom SPIH-Kanal vermittelte Depolarisation spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktivieren. Verschiedene spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle konnten in Seeigel-Spermien nachgewiesen werden. Sie wurden bisher jedoch vorwiegend mit der akrosomalen Exozytose in Verbindung gebracht (Lievano *et al.*, 1990; Beltran *et al.*, 1994). Zweitens schlagen Cook & Babcock (1993b) vor, dass der Ca^{2+} -Einstrom durch einen cAMP-regulierten Ca^{2+} -Kanal erfolgt. Drittens erörtern Schackmann & Chock (1986) die Möglichkeit, dass ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher für den Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich ist. Dabei soll zuerst durch eine Depolarisation die intrazelluläre Na^+ -Konzentration erhöht werden. Durch die erhöhte Na^+ -Konzentration soll ein Na^+ -Ausstrom ermöglicht werden, der über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher an einen Ca^{2+} -Einstrom gekoppelt ist. Im Gegensatz dazu behaupten Cook und Mitarbeiter (1994), dass der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher durch eine vorhergegangene Hyperpolarisation die Ca^{2+} -Konzentration verringert und gleichzeitig die Na^+ -Konzentration in den Spermien erhöht.

An Hand dieser kontroversen Ergebnisse und ihrer Interpretation erkennt man, dass trotz vieler Untersuchungen (z.B. Repaske & Garbers, 1983; Schackmann & Chock, 1986; Shimomura & Garbers, 1986a; Cook & Babcock, 1993a, b) die genaue Abfolge der einzelnen Reaktionen in den Spermien noch unklar ist.

1.3 Zielsetzung

Der Signalweg, der die Chemotaxis von Spermien kontrolliert, wurde bisher am ausführlichsten bei Seeigeln untersucht. Zwar gibt es ein ausführliches Modell des Signalweges (Abb. 1.3), dieses ist jedoch experimentell nur unzureichend abgesichert. Im folgenden werden beispielhaft einige Schwächen bisheriger Arbeiten dargestellt:

1. Die SAP-induzierte Hyperpolarisation konnte bisher nicht an intakten Spermien in einem physiologischen Puffer gemessen werden. Entweder wurde an hypotonisch geschwollenen Spermien oder nur an Spermien-Flagellen gemessen (Lee *et al.*, 1986; Babcock *et al.*, 1992; Galindo *et al.*, 2000), bzw. es wurden Puffer verwendet, die eine Hyperpolarisation der Spermien erzwangen (z.B. Cook *et al.*, 1993a; Galindo *et al.*, 2000).
2. Die Adenylzyklase soll in erster Linie über das Membranpotential, aber auch über den intrazellulären pH-Wert und über Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert werden (Beltran *et al.*, 1996). Eine Aktivierung über Ca^{2+} /Calmodulin konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Garbers, 1981; Bookbinder *et al.*, 1991).
3. Es werden verschiedene Mechanismen für die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration diskutiert. So gibt es z.B. für den von Cook und Mitarbeiter (1994) vorgeschlagenen Ca^{2+} -Ausstrom mittels eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers bisher keine experimentellen Hinweise. Ebenso ist es fraglich, ob der erstmals von Schackmann & Chock (1986) vorgeschlagene $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher den Ca^{2+} -Einstrom bewerkstelligt. An Hand ihrer Messungen behaupten sie nämlich, dass der Ca^{2+} -Einstrom und der Na^+ -Ausstrom nicht zeitgleich stattfinden. Damit könnte ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nicht für den Ca^{2+} -Einstrom in Frage kommen.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, das unter 1.2 beschriebene Modell des Signalwegs experimentell zu überprüfen. Dazu sollten erstmals zeitlich aufgelöste Messungen von Botenstoffmolekülen in intakten Spermien des Seeigels *A. punctulata* durchgeführt werden. Über den zeitlichen Ablauf der verschiedenen physiologischen Reaktionen sollten die ursächlichen Zusammenhänge entschlüsselt werden.

1. Das Modell schlägt als ersten Schritt vor, dass das SAP einen Anstieg der cGMP-Konzentration induziert. Aus diesem Grund sollte zuerst die Resact-induzierte Änderung der cGMP-Konzentration zeitlich aufgelöst gemessen werden. Dazu wurde die *Quenched-Flow*-Methode verwendet. Diese Methode ermöglicht es, Spermien in < 1 ms mit Resact

zu stimulieren. Der Reaktionsverlauf kann somit im Millisekunden- bis Sekundenmaßstab – also zeitlich aufgelöst – verfolgt werden.

2. Nach dem Modell verursacht der Anstieg der cGMP-Konzentration indirekt einen Anstieg der cAMP-Konzentration. Wenn diese Hypothese stimmt, müsste der cAMP-Anstieg erst nach dem cGMP-Anstieg beginnen. Dies sollte ebenfalls durch *Quenched-Flow*-Messungen überprüft werden.
3. Der cAMP-Anstieg soll einen Ca^{2+} -Einstrom auslösen. Der Anstieg der cAMP-Konzentration müsste also vor dem Ca^{2+} -Einstrom beginnen. Um das zu überprüfen, sollte der Resact-induzierte Ca^{2+} -Einstrom zeitlich aufgelöst gemessen werden. Dazu wurde die *Stopped-Flow*-Methode eingesetzt.
4. Des Weiteren sollte die Funktion von cAMP und cGMP mit Hilfe von sogenanntem *caged*-cAMP bzw. *caged*-cGMP untersucht werden. Aus diesen *caged*-Verbindungen kann man mit einem UV-Lichtblitz cAMP bzw. cGMP in den Spermien freisetzen und anschließend die cAMP- bzw. cGMP-induzierte Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration messen.
5. Das Modell geht auch davon aus, dass der pH-Anstieg den Ca^{2+} -Einstrom auslöst. Für die pH-Messungen wurde - wie bei den Ca^{2+} -Messungen - die *Stopped-Flow*-Methode verwendet.

Im zweiten Teil wurde untersucht, ob das SAP Asterosap die cGMP- und cAMP-Konzentration in Spermien des Seesterns *Asterias amurensis* verändert. Anhand der zeitlich aufgelösten Messungen soll gezeigt werden, in wieweit ähnliche Signalwege in Spermien verschiedener Tierklassen existieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Es wurden Chemikalien in p.A.-Qualität von den Firmen Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Eugene, USA) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.2 Optische Filter

Optische Filter wurden von den Firmen Schott (Wiesbaden, Mainz), Omega (Brattleboro, USA) und Chroma (Brattleboro, USA) bezogen.

2.1.3 Lösungen

Als Lösungsmittel diente, wenn nicht anders angegeben, H₂O.

ASW_{7,8} (*artificial seawater* pH 7,8; verwendet für Experimente mit *Arbacia punctulata*-Spermien):

423 mM NaCl

9 mM KCl

22,94 mM MgCl₂

25,5 mM MgSO₄

9,27 mM CaCl₂

0,1 mM EDTA

10 mM HEPES

J.ASW8,2 (verwendet für Experimente mit *Asterias amurensis*-Spermien)

430 mM NaCl

9 mM KCl

23 mM MgCl₂

25 mM MgSO₄

9 mM CaCl₂

10 mM HEPPS

Die Zahl hinter ASW gibt den eingestellten pH-Wert des ASW an. Dieser wurde jeweils durch Titration mit NaOH eingestellt. ASW7,0L enthielt statt 9,27 mM nur 1 mM CaCl₂.

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung der Seeigel

A. punctulata-Seeigel wurden vom Duke University Marine Laboratory (J. M. Keller, Beaufort, NC, USA) oder vom Marine Biological Laboratory (MBL) Woods Hole (Woods Hole, MA, USA) bezogen. Die Seeigel wurden in Seewassertanks des MBL bei ca. 14 °C gehalten und mit Meerespflanzen gefüttert, die vom MBL zur Verfügung gestellt wurden.

2.2.2 Entnahme der Spermien

Seeigel-Spermien wurden entnommen, indem 0,5 – 1 ml 0,5 M KCl durch das Mundfeld des Seeigels in das Coelom injiziert wurden (Palmer, 1937; Silver *et al.*, 1980). Falls der Seeigel dadurch nicht absamte, wurde er zusätzlich elektrisch stimuliert. Hierzu wurde mittels zweier Elektroden eine Spannung von ca. 25 V an das Tier angelegt. Das austretende Sperma bezeichnet man als *dry sperm*.

Dry sperm von *A. amurensis*-Seesternen wurde nach der Methode von Matusi *et al.* (1986) erhalten. Wir bezogen das *dry sperm* von M. Matsumoto, Center for Life Science and Technology, Keio University, Japan.

2.2.3 Vitalitätsbestimmung der Spermien

Die Beweglichkeit der Spermien von *A. punctulata* und *A. amurensis* wurde als ein Kriterium für ihre Vitalität genommen. 100 µl einer 1:100 bis 1:1000 Verdünnung der Spermienstammsuspension (siehe 2.2.4.1) wurden auf einen Objektträger pipettiert und die Spermien im Phasenkontrast mikroskopiert. Ca. 90% der Spermien waren motil. Grundsätzlich wurde bei *A. punctulata* nur *dry sperm* verwendet, das weniger als 6 h alt war. Die *A. amurensis*-Spermien wurden auf Eis aus Japan geschickt.

2.2.4 Beladung der Seeigel-Spermien mit Ca^{2+} -, pH-Indikatoren und *caged* zyklischen Nukleotiden

2.2.4.1 Ca^{2+} -Indikator

Für die anfänglichen Experimente wurde *dry sperm* 1:6 (v/v) mit ASW7,0L verdünnt, welches 10 µM Fluo-4AM (Stammlösung 1 mM in DMSO; Molecular Probes) und 0,5 % Pluronic-F-127 (Stammlösung: 10 % in H₂O; Sigma) enthält. Diese Suspension bezeichne ich als Spermienstammsuspension. Für die späteren Experimente wurde anstatt ASW7,0L ASW7,5 verwendet. Die Spermien wurden 45 bis 120 min bei 17°C mit dem Indikator beladen. Anschließend wurde die Spermienstammsuspension 1:20 (v/v) mit ASW7,5 verdünnt und ca. 5 min bis zum Beginn der Messung äquilibriert. Die Zellen wurden innerhalb der nächsten ca. 15 min für die *Stopped-Flow*-Experimente verwendet (Details siehe 3.1.2.1.7). Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Spermien suspension enthielt bei den Ca^{2+} - und pH-Experimenten 1,8 bis 8,8 x 10⁸ Spermien/ml.

2.2.4.2 pH-Indikator

Spermien wurden mit 10 µM BCECF-AM (Molecular Probes; Stammlösung: 1 mM in DMSO) 15 bis 30 min inkubiert. Alle anderen Bedingungen waren identisch mit denen der Fluo-4-Beladung (2.2.4.1).

2.2.4.3 *caged*-zyklische Nukleotide

Spermien wurden wie in 2.2.4.1 beschrieben mit Fluo-4AM inkubiert, außer dass die Spermienstamm suspension zusätzlich 100 μM BECMCM-*caged*-cAMP oder cGMP (Stammlösungen: 10 mM in wasserfreiem DMSO) enthielt. Nach dem Ansetzen einer Stammlösung wurde sie aliquotiert und bei -20°C gelagert. Einmal aufgetaute Aliquots wurden direkt verwendet, Reste der aufgetauten Lösung wurden verworfen.

2.2.5 Prinzip der *Stopped*- und *Quenched-Flow*-Messungen

Das *Stopped-Flow*-Verfahren ermöglicht es, den Zeitverlauf biochemischer Prozesse im Millisekunden- bis Sekundenmaßstab zu untersuchen (Johnson, 1986; Tareilus *et al.*, 1995). Dieses Verfahren beruht darauf, Flüssigkeiten innerhalb kürzester Zeit zu mischen und den Zeitverlauf der dabei entstehenden Reaktion zu beobachten. Die Reaktionen können prinzipiell auf zweierlei Weisen verfolgt werden:

1) Das aus der Mischkammer fließende Reaktionsgemisch wird durch eine Beobachtungskammer geleitet und im kontinuierlichen Durchfluss beobachtet (*continous-flow*-Modus; Gutfreund, 1969). Wird die Reaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt chemisch oder thermisch unterbrochen und das Reaktionsgemisch anschließend analysiert, so spricht man von dem *Quenched-Flow*-Modus (Tareilus *et al.*, 1995).

2) Der Flüssigkeitsstrom wird in der Beobachtungskammer angehalten, um den zeitlichen Zeitverlauf der Reaktion beobachten zu können. Die Beobachtung wird z.B. auf optischem, kalorimetrischem oder elektrischem Wege durchgeführt. Diese Methode wird als *Stopped-Flow*-Modus bezeichnet (Gibson, 1969).

Wie schnell eine Reaktion beobachtet werden kann, nachdem die Reaktanden gemischt wurden, hängt sowohl von der Flussgeschwindigkeit (F) der Reaktanden als auch von dem zu durchfließenden Volumen (V) in der Apparatur ab. Für die Dauer (T) der Reaktion bis zum Beobachtungs- bzw. Quenchezitpunkt ergibt sich:

$$T = V/F$$

Durch Veränderung der Flussgeschwindigkeit oder durch Veränderung des Volumens der Reaktionskammern kann eine Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet werden.

2.2.5.1 Aufbau der *Stopped-Flow*-Apparatur

Es wurde eine *Stopped-Flow*-Apparatur der Firma BioLogic (SFM-4, BioLogic, Grenoble, Frankreich) benutzt. Die Abb. 2.1 zeigt eine schematische Darstellung der Anlage.

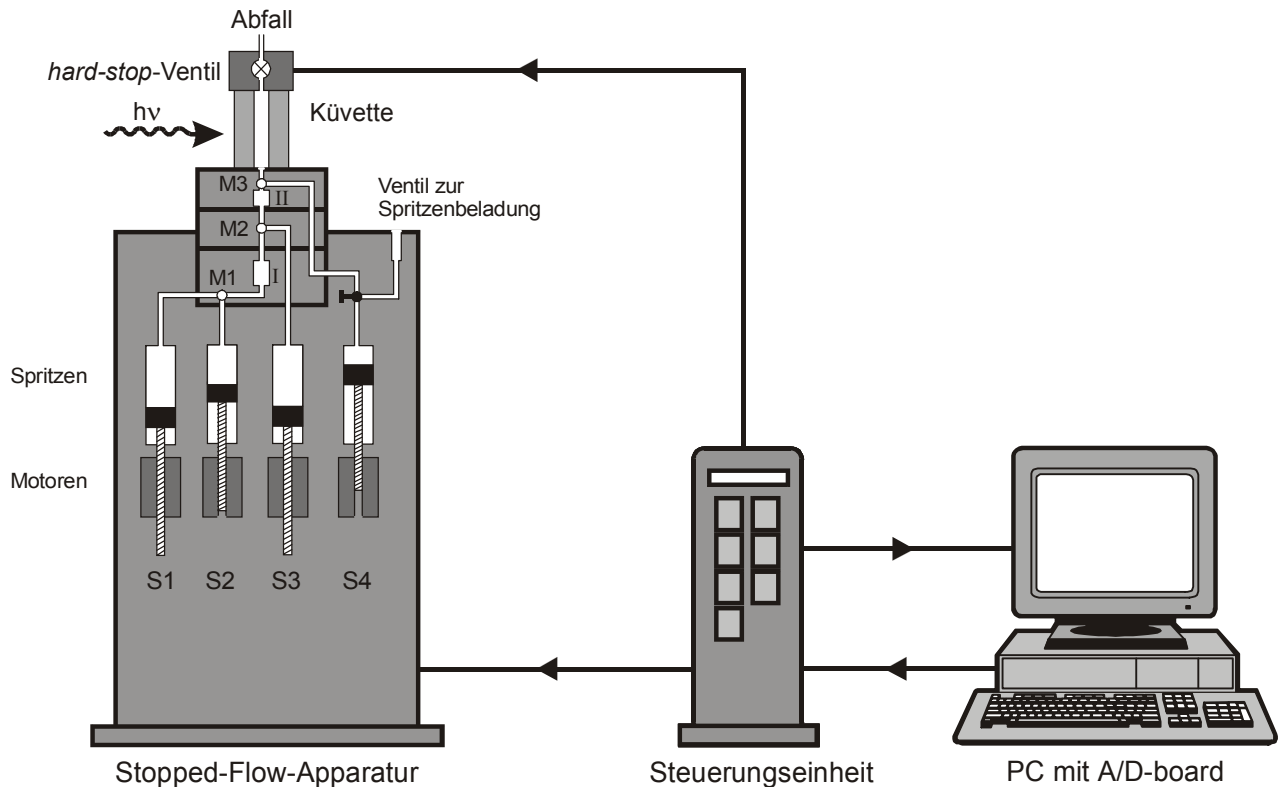


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der *Stopped-Flow*-Apparatur. Erklärungen im Text.

Das Kernstück der *Stopped-Flow*-Apparatur war das SFM-4-Modul, das vier 20 ml Spritzen (S1, S2, S3 und S4) enthielt. Die Spritzen konnten jeweils über ein Ventil durch externe Eingänge mit den zu mischenden Flüssigkeiten gefüllt werden (nur für S4 gezeigt).

Die Stempel der Spritzen konnten durch Schrittmotoren gesteuert werden. Das Ausstoßvolumen der Spritzen betrug 4,54 μ l pro Schritt. Die Flussgeschwindigkeiten lagen zwischen 0,05 und 8,00 ml/s bei den 20 ml Spritzen. Die Schrittmotoren wurden durch einen Personal-Computer (Pentium II, 64MB RAM) über eine Steuerungseinheit (MPS-52, BioLogic) angesteuert. Als Steuerungssoftware diente die MPS-Software (V.1.21, BioLogic). Die Flüssigkeiten konnten in 3 Mischkammern (M1-M3) miteinander vermischt werden. Die Mischkammern sind in Abb. 2.1 als Kreise dargestellt. Zwischen den Mischkammern konnten

bei Bedarf zwei Reaktionskammern (I, II) mit unterschiedlichen Reaktionsvolumina installiert werden. Die Reaktionskammern waren in Edelstahl- oder spezielle Kunststoffblöcke gebohrt, die man in unterschiedlichen Kombinationen in das Röhrensystem einbauen konnte. Diese Blöcke sind in Abb. 2.1 als graue Rechtecke, die Reaktionskammern I und II als weiße Rechtecke dargestellt. Ohne die Reaktionskammern I und II betrug das Volumen der Röhren zwischen M1 und M2 17 μl bzw. zwischen M2 und M3 22 μl . Als Beobachtungskammer für den Zeitverlauf der Reaktion diente eine Quarzküvette (FC-15) mit 31 μl Reaktionsvolumen, die hinter M3 eingebaut war. Um Schwankungen der Flüssigkeitssäule in der Küvette und dadurch Schwankungen des Messsignals zu verhindern, konnte ein *hard-stop*-Ventil hinter der Küvette direkt nach der Injektion einer Flüssigkeit in die Messküvette geschlossen werden. Das Ventil wurde über die Steuerungssoftware der *Stopped-Flow*-Apparatur angesteuert.

Die *Stopped-Flow*-Apparatur wurde mit einem Messsystem erweitert, dass es erlaubte, Fluoreszenz in der Küvette zu messen (siehe 2.2.5.2).

2.2.5.2 Aufbau der Anlage für Fluoreszenzmessungen

Um die Fluoreszenzänderungen in der Küvette der *Stopped-Flow*-Apparatur messen zu können, wurde die Apparatur erweitert. Die Kombination aus *Stopped-Flow*-Apparatur und fluorimetrischem Messsystem ist in Abb. 2.2 in Aufsicht dargestellt. Als Quelle für das Anregungslicht der Ca^{2+} - und pH-Indikatoren diente eine 150 Watt Xe/Hg-Lichtbogenlampe (Hamamatsu, Japan). Das Anregungslicht wurde über eine Linse in einen Lichtleiter (Schott, Maßanfertigung) eingekoppelt und dadurch auf die Messküvette gestrahlt. Um die Wellenlängen zur Anregung der Ca^{2+} - und pH-Indikatoren auszuwählen, wurden zwei FITCA-40 Interferenzfilter (2 mm; Schott; Abb. 2.2, Filter: 1c, d) verwendet. Vor die Interferenzfilter wurden ein Wärmeschutzfilter (3 mm; KG1, Schott; Abb. 2.2, Filter 1a) und zwei 400 nm Langpassfilter (3 mm; GG400, Schott; Abb. 2.2, Filter 1b) eingebaut. Diese Filter schützen die Interferenzfilter vor einer Beschädigung durch Wärme bzw. vor der Solarisation durch UV-Licht. Die Fluoreszenz wurde mit einem Photomultiplier (HTV-R376, Hamamatsu, Japan) detektiert, der im rechten Winkel zum Strahlengang des Anregungslichts installiert wurde. Bei den Ca^{2+} - und pH-Messungen wurde zwischen der Küvette und dem Photomultiplier zwei 495 nm Langpassfilter (3 mm; GG495, Schott, Abb. 2.2, Filter 2a, b) eingebaut, die verhindern sollten, dass an den Spermien gestreutes Anregungslicht auf den

Photomultiplier gelangt. Desweiteren wurden zwei FITCE-45 Interferenzfilter (2 mm; Schott, Abb. 2.2, Filter 2c, d) verwendet. Diese verhinderten, dass Anregungslicht, das langwelliger als das Fluoreszenzlicht der Ca^{2+} - oder pH-Indikatoren war, vom Photomultiplier detektiert wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurde für die Messungen der Ca^{2+} - und pH-Signale eine Spannung von 500 V an den Photomultiplier angelegt.

Über einen UV-durchlässigen Lichtleiter konnte Licht für die Photolyse von *caged*-Verbindungen auf die Messküvette geleitet werden. Als Lichtquelle diente eine Xe-Blitzlampe (Strobex 278; Chadwick-Helmuth, USA). Zwischen Lampe und Lichtleiter wurden zwei DUG11 Interferenzfilter (2 mm; Schott, Abb. 2.2, Filter 3c, d) eingebaut um nur das für die Photolyse der *caged*-Verbindungen benötigte UV-Licht zur Messküvette durchzulassen. Durch diese Filter wurde der Photomultiplier gleichzeitig vor Licht geschützt, welches die Filter zwischen Messküvette und Photomultiplier hätte passieren können. Die Energie eines Blitzes an der Oberfläche der Messküvette betrug $26,8 \text{ mJ cm}^{-2}$ bei 150 Ws Eingangsleistung. Die Fläche, die auf der Messküvette bestrahlt wurde, betrug $0,135 \text{ cm}^2$ ($1,5 \times 9 \text{ mm}$). Zwischen den Interferenzfiltern und der Blitzlampe konnten Quarz-Graufilter mit einer linearen Transmission im UV/VIS-Spektrum (Deutsche Balzers, Geisenheim; Schott; Abb. 2.2, Filter 3a, b) zur Einstellung der Blitz-Energie eingefügt werden.

Um möglichst große Fluoreszenzsignale messen zu können und damit das Signal-Rauschverhältnis zu verbessern, sollte die Intensität des Anregungslichts maximiert werden. Dazu wurde mit Hilfe eines Lichtmessgeräts (Model 550-1 EG&G, San Diego, Kalifornien) die Einkopplung der Xe/Hg-Lampe in den Lichtleiter optimiert, indem die Lichtintensität am Ausgang des Lichtleiters gemessen wurde. Auf die selbe Weise wurde die Lichtintensität des UV-Blitzes optimiert, um möglichst viel der *caged*-Verbindungen freisetzen zu können.

Die Temperatur der *Stopped-Flow*-Apparatur wurde bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten mittels eines Thermostaten (D3/G, Haake, Berlin) auf 17°C eingestellt und konstant gehalten.

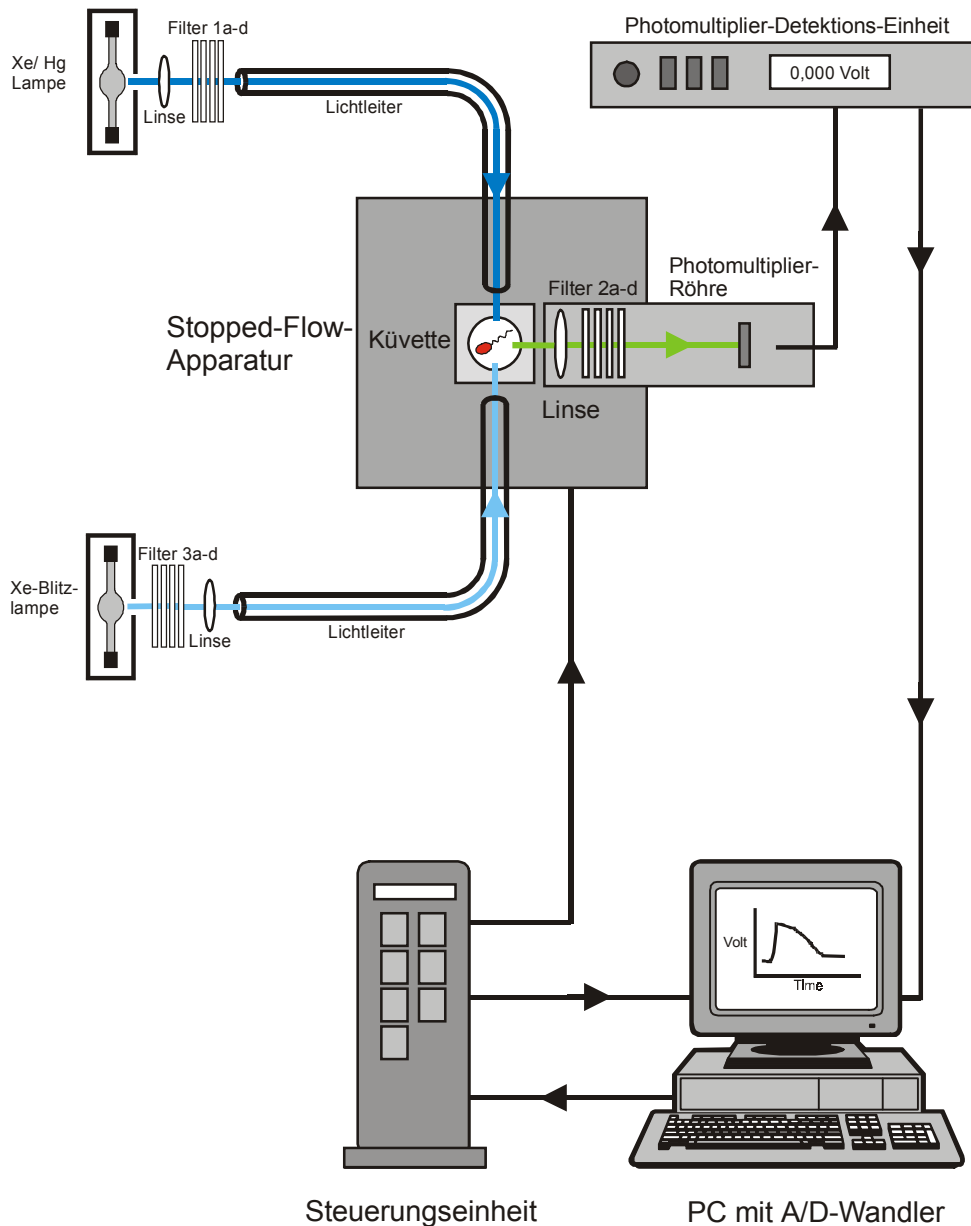


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Kombination aus *Stopped-Flow*-Apparatur und fluorimetrischem Messsystem. Erklärung im Text.

2.2.5.3 Durchführung der Fluoreszenzmessungen

Mit Hilfe der *Stopped-Flow*-Apparatur konnten vier verschiedene Lösungen gemischt werden. Die Lösungen wurden von den Spritzen S1 – S4 in die verschiedenen Mischkammern (M1 – M3) gepresst. Von der Mischkammer M3 floss das Reaktionsgemisch in die Küvette. Die Zeitspanne, die zwischen dem Mischen der Reaktionspartner und dem Beobachtungsbeginn vergeht, wird als sogenannte „Tot-Zeit“ bezeichnet. Die Tot-Zeit hängt von zwei Faktoren ab:

1. Von der Geschwindigkeit, mit der das Reaktionsgemisch von der Mischkammer in die Küvette fließt, und 2. von dem Volumen, durch welches das Reaktionsgemisch fließen muss. Um eine möglichst geringe Tot-Zeit zu erreichen, wurden die beiden Reaktionspartner daher in Mischkammer M3 gemischt. Aus Spritze 3 bzw. 4 wurde SAP-haltiges ASW bzw. die Spermien-Suspension in die Mischkammer injiziert und dort in weniger als 1 ms gemischt. Spritze S1 wurde mit Puffer - in diesem Fall ASW – befüllt, der zum Spülen der Mischkammern und der Küvette diente. Für die Fluoreszenzmessungen wurden keine Reaktionskammern in die *Stopped-Flow*-Apparatur eingebaut.

Die Flussgeschwindigkeit, mit der das Reaktionsgemisch von der Mischkammer in die Küvette floss, wurde durch ein sogenanntes „Spritzenprogramm“ bestimmt. Dieses Spritzenprogramm wurde mit dem MPS-Programm im PC entworfen. Ein Experiment wurde dabei in einzelne Phasen unterteilt. Im Programm wurde die Dauer der einzelnen Phasen festgelegt. Außerdem wurde festgelegt, aus welcher Spritze welches Volumen in die jeweilige Mischkammer ausgestoßen wird. Aus dem gesamten Ausstoßvolumen einer Phase und der Phasendauer ergab sich die Flussgeschwindigkeit. Indem man den Parameter *Synchro 1* auf *on* stellte, bestimmte man den Zeitpunkt, an dem das vom Photomultiplier gemessene Signal aufgezeichnet wurde. Die Dauer der Aufnahme sowie andere Parameter der Aufnahme wurden mit Hilfe der BioKine-Software bestimmt, welche unabhängig von der Programmierung der MPS-Software war.

Phase	1	2	3	4	5	6
Phasendauer (ms)	50	200	300	200	1300	10
Spritze 1 (µl) (ASW)		500				
Spritze 2 (µl) (-)						
Spritze 3 (µl) (ASW mit SAP)				100		
Spritze 4 (µl) (Spermiensuspension)				100		
Synchro 1	On	Off	Off	Off	Off	Off
Synchro 2	Off	Off	Off	Off	Off	On

Tab. 2.1: Beispiel des normalerweise für die *Stopped-Flow*-Messung verwendeten Spritzenprogramms.
Erklärung im Text.

In Tab. 2.1 ist exemplarisch ein Spritzenprogramm einer Messung dargestellt. Phase 1 dauerte 50 ms und diente dazu die Schrittmotoren der Spritzen zu synchronisieren und die

Aufzeichnung des Messsignals mit dem Photomultiplier zu starten. Phase 2 dauerte 200 ms. Während dieser Zeit wurde ein Volumen von 500 µl aus der Spritze S1 in das Röhrensystem gepresst, um Überreste von Reaktanden der vorigen Messung wegzuwaschen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 2,5 ml/s. Die Flüssigkeit verblieb für 300 ms im Röhrensystem (Phase 3). In Phase 4 wurden jeweils 100 µl aus Spritze 3 und 4 mit einander gemischt. Da die Phasendauer 200 ms war, betrug die Flussgeschwindigkeit 1,0 ml/s. Die Tot-Zeit betrug 31 ms.

Für die Photolyse von *caged*-Verbindungen konnte eine Blitzlampe, die über einen Lichtleiter an die Messküvette gekoppelte war zu einem beliebigen Zeitpunkt ausgelöst werden. Dazu wurde in Phase 6 *Synchro 2* auf *on* gestellt, so dass der Lichtblitz mittels eines TTL-Pulses ausgelöst wurde. Phase 5 diente nur dazu, den Zeitpunkt des Blitzes zu bestimmen.

Das lichtinduzierte Spannungssignal der Photomultiplier-Röhre wurde über die Photomultiplier-Detektions-Einheit an einen PC mit installiertem A/D-Wandler weitergeleitet und dann mit der BioKine-Software aufgezeichnet und bearbeitet.

2.2.6.1 Aufbau der Anlage für *Quenched-Flow*-Messungen

Der Zeitverlauf der cNMP-Konzentration nach Stimulation der Spermien wurde mit Hilfe von *Quenched-Flow*-Experimenten bestimmt. Dazu wurde die Messküvette zusammen mit dem *hard-stop*-Ventil (siehe Abb. 2.1) und den anderen optischen Komponenten entfernt und gegen ein spezielles Ventil ausgetauscht. Das Ventil ermöglichte es, die aus M3 austretenden Flüssigkeitsgemische in einer Auffangpipette zu sammeln oder sie zu verwerfen. Als Auffangpipetten dienten 1,3 ml Kunststoff-Pipetten (bezogen von BioLogic). Zusätzlich wurden verschiedene Kombinationen von Reaktionskammern zwischen M1 und M3 eingebaut.

2.2.6.2 Durchführung der *Quenched-Flow*-Messungen

Spermien in ASW7,8 mit einer Zelldichte von 0,3 bis 10×10^8 Spermien/ml (Spermienstammsuspension) wurden in Spritze 1 gefüllt und mit ASW aus Spritze 2 in M1 gemischt (siehe Abb. 2.1). ASW7,8 in Spritze 2 enthielt bestimmte Konzentrationen des SAPs zur Stimulation der Spermien. Die Spermien wurden weiter in Richtung M3 gedrückt und

konnten währenddessen mit dem SAP reagieren. M2 war bedeutungslos, da Spritze 3 nicht gebraucht wurde. In M3 wurden die Spermien durch das Mischen mit HClO_4 (0,5 M Endkonzentration) gequencht d.h., die Spermien wurden unmittelbar getötet, so dass jeder weitere Auf- oder Abbau von cAMP oder cGMP unterdrückt wurde.

Tabelle 2.2 zeigt exemplarisch das Spritzenprogramm eines Experiments.

Phase	1	2	3
Phasendauer (ms)	50	284	454
Spritze 1 (µl) (Spermiensuspension)		250	400
Spritze 2 (µl) (ASW mit SAP)		250	400
Spritze 3 (µl) (-)			
Spritze 4 (µl) (HClO_4)		250	400
Ventil	A	A	B
Synchro	On	Off	Off

Tab. 2.2: Spritzenprogramm eines *Quenched-Flow-Experiments*. Erklärung im Text.

Phase 1 diente zum Synchronisieren der Schrittmotoren. Im Verlauf von Phase 2 wurden während 284 ms aus den Spritzen 1, 2 und 4 gleichzeitig jeweils 250 µl durch die Misch- und Reaktionskammern zum Ausgang gedrückt und verworfen (Ventil: A). Phase 2 diente dazu, die von der vorigen Messung übrig gebliebenen Reste der Reaktanden aus Misch- und Reaktionskammern wegzuwaschen. Während Phase 3 wurden jeweils 400 µl aus Spritze 1, 2 und 4 gleichzeitig innerhalb von 454 ms durch die Misch- und Reaktionskammern in die Auffangpipette gedrückt (Ventil: B). In Phase 2 und 3 hatten die angesteuerten Spritzen jeweils eine Ausstoßgeschwindigkeit von 0,845 ml/s. Die Fließgeschwindigkeit der Spermiensuspension aus Spritze 1 verdoppelte sich ab M1 auf 1,690 ml/s durch den gleichstarken Zustrom des SAP-haltigen ASW aus Spritze 2. Die verwendeten Reaktionskammern hatten ein Volumen von 40 µl (I) und 90 µl (II). Zusammen mit dem Mindestvolumen ergab sich ein Gesamtvolumen von 169 µl zwischen M1 und M3. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,690 ml/s und einem Volumen von 169 µl konnten die Spermien 100 ms mit dem SAP reagieren, bevor die Reaktion in M3 durch Mischen mit HClO_4 gequencht wurde.

Tabelle 2.3 gibt die jeweiligen Phasendauern an, die für die verschiedenen Reaktionszeiten erforderlich waren.

Reaktionszeit in ms	Phasendauer in ms (Phase 2)	Phasendauer in ms (Phase 3)
25	72	114
50	142	227
100	284	454
200	568	908
400	1136	1817
800	2272	3634
1600	4544	7269
5000*	10492	3497
10000*	20984	6995

Tab. 2.3: Phasendauern in Abhängigkeit von den Reaktionszeiten. Bei denen mit * markierten Reaktionszeiten mussten Reaktionskammern mit 1000 µl (I) und 90 µl (II) verwendet werden. Unter dieser Bedingung wurden in Phase 2 jeweils 1200 µl von den Spritzen 1, 2 und 4 anstatt jeweils 250 µl ausgestoßen.

Die mit der Pipette aufgefangenen Proben (1200 µl pro Probe) wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.6.3 Auswertung der *Quenched-Flow*-Proben

Die gefrorenen Proben wurden aufgetaut, kurz gevortext und zum völligen Aufschluss der Spermien fünf Sekunden sonifiziert (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury USA, ~ 90 W). Die Proben wurden durch Zugabe von 400 µl (v/v) 0,952 M K₃PO₄ (Endkonzentration 0,238 M) neutralisiert. Das KClO₄-Präzipitat und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15.000xg, 15 min, 4°C) sedimentiert. Die cAMP- und cGMP-Konzentrationen wurden jeweils mit 50-200 µl des Überstands mittels Radioimmunoassays (¹²⁵I-cGMP oder ¹²⁵I-cAMP; IBL, Hamburg) nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Kontrollstandards zur Erstellung der Kalibrierungskurven wurden in ASW7,8 bzw. J. ASW8,2 verdünnt und wie die Spermien mit HClO₄ und K₃PO₄ behandelt.

Ein Messpunkt stellt immer den Mittelwert ± der Standardabweichung von drei direkt hintereinander gewonnenen und ausgewerteten Proben dar.

Sperm activating peptides (SAP) lösen verschiedene physiologische Reaktionen aus, die unter anderem das chemotaktische Schwimmverhalten der Spermien steuern. Umfangreiche Untersuchungen der einzelnen Schritte des SAP-induzierten Signalwegs haben zu einem Modell geführt, das in Abb. 1.3 gezeigt ist. Das Modell ist jedoch nach unserer Auffassung experimentell nur unzureichend abgesichert (siehe Diskussion). Deshalb sollte in dieser Doktorarbeit mit Hilfe zeitlich aufgelöster Messungen die Abfolge und die kausalen Zusammenhänge der physiologischen Reaktionen überprüft werden. Mit der *Quenched-Flow*-Methode wurde der Zeitverlauf der SAP-induzierten Änderungen der cAMP- und cGMP-Konzentration gemessen, während mit der *Stopped-Flow*-Methode der SAP-induzierte Ca^{2+} -Einstrom und der Anstieg des pH-Werts gemessen wurde. Mit Ausnahme von *Quenched-Flow*-Messungen an Spermien von *Strongylocentrotus purpuratus* (Godde, 1996) wurden diese Methoden bisher nicht für Messungen an intakten Spermien verwendet. Der Ergebnissteil ist in zwei Teile gegliedert. Unter 3.1 beschreibe ich, wie beide Methoden optimiert wurden und weise auf Schwierigkeiten hin. Unter 3.2 präsentiere ich Ergebnisse von Experimenten, die an Spermien des Seeigels *Arbacia punctulata* und des Seesterns *Asterias amurensis* durchgeführt wurden.

3.1 Optimierung der Methoden

3.1.1 *Quenched-Flow*-Methode

Die *Quenched-Flow*-Methode wurde mit einem Radioimmunoassay (RIA) kombiniert. Dadurch war es erstmals möglich, die SAP-induzierten Änderungen der cGMP- und cAMP-Konzentration – kurz cNMP-Konzentration - an intakten Spermien von *A. punctulata* und *A. amurensis* zeitlich aufgelöst zu messen.

3.1.1.1 Werden die Spermien durch den Mischvorgang geschädigt?

Spermien wurden unterschiedlich lange mit SAP stimuliert und die zeitliche Änderung der cNMP-Konzentration wurde gemessen (2.2.6.6). Die Stimulationszeit wird durch die

Flussgeschwindigkeit bestimmt, mit der die Spermien durch das Röhrensystem gepresst werden. Bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten wirken unterschiedlich große Scherkräfte auf die Spermien ein. Um den Einfluss des Mischvorgangs auf die Morphologie und die Motilität von *A. punctulata*- und *A. amurensis*-Spermien zu untersuchen, wurde die Spermiesuspension mit ASW (artificial sea water) im Verhältnis 1:1 bei Flussgeschwindigkeiten von 0,11 bis 6,90 ml/s gemischt. Nach dem Mischen wurden die Spermien unter dem Mikroskop untersucht (2.2.3). Selbst durch hohe Flussgeschwindigkeiten wurden die Spermienköpfe nicht von den Flagellen abgetrennt, und es konnten keine offensichtlichen Veränderungen des Schwimmverhaltens beobachtet werden. Allerdings habe ich keine statistisch abgesicherte quantitative Analyse des Schwimmverhaltens durchgeführt.

3.1.1.2 Wird die cNMP-Ruhekonzentration durch den Mischvorgang verändert?

Obwohl die Morphologie und Motilität der Spermien nicht durch den Mischvorgang beeinträchtigt wurden, sollte dennoch untersucht werden, ob der Mischvorgang die cNMP-Konzentration in unstimulierten Spermien (Ruhekonzentration) verändert. Dazu wurden Suspensionen von *A. punctulata*- und *A. amurensis*-Spermien mit ASW bei Flussgeschwindigkeiten von 0,11 bis 6,90 ml/s gemischt und dann mit Perchlorsäure gequencht. Anschließend wurde die cGMP- und cAMP-Konzentration in den Proben mit Hilfe eines Radio-Immuno-Assays (RIA) bestimmt (2.2.6.3).

Bei *A. amurensis*-Spermien wurde dieses Experiment nur einmal durchgeführt. Sowohl bei der cGMP- als auch bei der cAMP-Ruhekonzentration war keine Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit zu erkennen.

In Abb. 3.1 ist die cNMP-Ruhekonzentration von *A. punctulata*-Spermien in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit dargestellt (1 von 9 Experimenten). Die cGMP-Ruhekonzentration bleibt bei *A. punctulata*-Spermien im Vergleich zu *A. amurensis*-Spermien nur bei Flussgeschwindigkeiten $\leq 1,8$ ml/s (Stimulationszeit $\geq 0,1$ s) konstant. Bei höheren Flussgeschwindigkeiten nahm die cGMP-Ruhekonzentration kontinuierlich ab. Bei 6,9 ml/s (25 ms Stimulationszeit) beträgt sie nur noch das 0,2 bis 0,5-fache der Ruhekonzentration, die bei Flussgeschwindigkeiten $\leq 1,8$ ml/s gemessen wurde. Die Ursache für die Konzentrationsabnahme ist unbekannt. Verglichen mit den Werten der cGMP-Konzentration streuten die Werte der cAMP-Konzentrationen wesentlich stärker. Die Ursache dafür ist

ebenfalls unbekannt. Eine Abhängigkeit der cAMP-Ruhekonzentration von der Flussgeschwindigkeit ist nicht zu erkennen (4 Experimente).

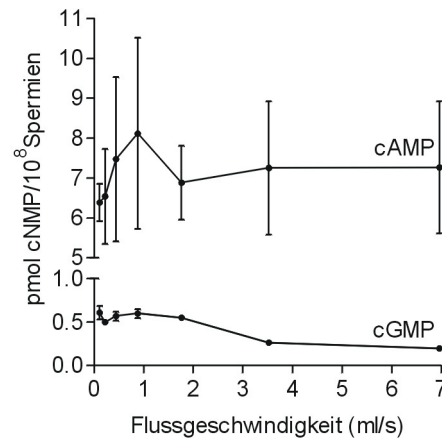


Abb. 3.1: cNMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit. *A. punctulata*-Spermien wurden 1:1 mit ASW gemischt und mit Flussgeschwindigkeiten von 0,11 bis 6,90 ml/s durch die *Stopped-Flow*-Apparatur gepresst. Die Messwerte bestehen jeweils aus dem Mittelwert dreier direkt hintereinander gewonnener Proben. Im Folgenden wird diese Mittelung als Dreifachbestimmung bezeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an.

3.1.1.3 Verändert sich die cNMP-Ruhekonzentration während eines Experiments?

Für die Durchführung eines *Quenched-Flow*-Experiments benötigt man bis zu ~ 2 Stunden. Während dieser Zeit befinden sich die Spermien als verdünnte Suspension entweder auf Eis oder bei 17 °C in einer Spritze der *Stopped-Flow*-Apparatur. Um zu überprüfen, ob sich die cGMP- und cAMP-Ruhekonzentrationen während der Messzeit ändern, habe ich die Konzentrationen am Anfang und am Ende eines Experimentes bestimmt. Tab. 3.1 zeigt, dass sich in *A. punctulata*-Spermien weder die cGMP- noch die cAMP-Ruhekonzentrationen im Laufe eines Experiments ändern.

In *A. amurensis*-Spermien war die cGMP-Ruhekonzentration in zwei von drei Experimenten konstant. In einem Experiment kam es jedoch zu einem 4-fachen Anstieg. Die Änderung der cAMP-Ruhekonzentration mit der Messzeit wurde bei *A. amurensis*-Spermien

nicht bestimmt, da nur bei einer Asterosap-Konzentration (1 μM) gemessen wurde und deshalb die Messzeit kurz war.

Tab. 3.1: cGMP- und cAMP-Ruhekonzentrationen am Anfang und Ende eines *Quenched-Flow*-Experiments.

	<i>A. punctulata</i>		<i>A. amurensis</i>	
	pmol/ 10^8 Spermien ^a	Bereich	pmol/ 10^8 Spermien ^a	Bereich
[cGMP] _{Anfang}	$0,5 \pm 0,3$ (9)	0,1 - 1,0	$0,5 \pm 0,1$ (3)	0,5 – 0,6
[cGMP] _{Ende}	$0,5 \pm 0,3$ (9)	0,1 - 0,9	$1,0 \pm 0,8$ (3)	0,4 – 1,9
[cAMP] _{Anfang}	$6,5 \pm 3,0$ (3)	4,4 - 9,9	-	-
[cAMP] _{Ende}	$6,3 \pm 4,0$ (3)	2,8 - 10,6	-	-

^a Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (Anzahl der Experimente).

Der Mittelwert wurde aus den Messwerten verschiedener Experimente (Tiere) errechnet. Der Messwert eines Experiments besteht wiederum aus dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

3.1.1.4 Wie lassen sich SAP-Kontaminationen entfernen?

Die Resact-Konzentration, die für die cNMP-, Ca^{2+} - und pH-Messungen eingesetzt wurde, reichte von 125 fM bis 250 nM, also über mehr als 6 Größenordnungen. Die Messungen wurden mit aufsteigenden Konzentrationsreihen durchgeführt. Nach dem Experiment wurde das Röhrensystem bzw. die Küvette gespült, bevor ein neues Experiment begonnen wurde. Bei den Ca^{2+} -Messungen, die später beschrieben werden, beobachtete ich, dass ASW alleine (also ohne Resact) ein Ca^{2+} -Signal auslösen kann, vor allem dann, wenn zuvor hohe Resact-Konzentrationen verwendet worden waren. Die Ca^{2+} -Signale hatten die Größe und Form von Ca^{2+} -Signalen, die durch picomolare Resact-Konzentrationen ausgelöst wurden. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die Ca^{2+} -Signale durch eine Kontamination des Messstandes mit Resact hervorgerufen worden waren. Das Röhrensystem der *Stopped-Flow*-Apparatur ist aus verschiedenen Komponenten wie z.B. Spritzen, Röhren, Dichtungsringe und Mischkammern zusammengesetzt (Abb. 2.2). Zwischen diesen Komponenten gibt es mikroskopisch kleine Spalten. Resact könnte sich in diesen Spalten ansammeln und/oder es könnte an bestimmte Komponenten der Apparatur haften. Bei späteren Messungen löst sich Resact und gelangt so in die Spermien- oder ASW-Lösung.

Die Kontamination war nach *Quenched-Flow*-Messungen größer als nach *Stopped-Flow*-Messungen. Bei den *Quenched-Flow*-Messungen wurden größere Volumina und hohe Resact-Konzentrationen mit bis zu 7-mal höheren Flussgeschwindigkeiten durch die Apparatur gepresst. Dabei gelangte wahrscheinlich mehr Resact in die Spalten des Röhrensystems als bei den *Stopped-Flow*-Messungen.

Häufig konnte die Kontamination nicht durch „einfaches“ Waschen der Apparatur mit ASW entfernt werden. Deshalb probierte ich weitere Wasch-Methoden aus:

1. Waschen mit destilliertem H₂O, ASW, Ethanol, 0,1 M HCl oder 0,1 M NaOH.
2. Inkubation der Apparatur mit einer Spermisuspension für 5-60 min. Wegen der hohen Affinität des Resact-Rezeptors (siehe 3.2.2.3) sollten selbst geringe Resact-Kontaminationen entfernt werden.
3. Inkubation der Apparatur mit der thermophilen Protease Thermolysin über Nacht bei 60°C. Die Sequenz von Resact lässt erwarten, dass Resact an drei Stellen durch Thermolysin gespalten wird.
4. Ausbau und Reinigung des Röhrensystems, der Küvette und der Spritzen mit 0,1 M NaOH und 0,1 M HCl.

Je nach Hartnäckigkeit der Kontamination musste man die Waschschritte mehrmals wiederholen oder miteinander kombinieren. Tab. 3.2 fasst die wirkungsvollsten Reinigungsmethoden zusammen.

Tab. 3.2: Methoden zur Dekontamination des Messstands von Resact.

Resact-Konzentration	Dekontaminationsverfahren
≤ 1 nM	1. Mehrmaliges Waschen mit dest. H₂O und ASW. 2. Ließ sich noch eine Kontamination nachweisen, wurden die Waschschritte wiederholt oder die Apparatur wurde mit verdünntem <i>dry sperm</i> inkubiert. 3. Waschen mit Ethanol und dest. H₂O.
≥ 1 nM	1. Waschen mit ASW, dest. H₂O und HCl. 2. Inkubation mit verdünntem <i>dry sperm</i>. 3. Waschen mit Ethanol und dest. H₂O. 4. Ließ sich noch eine Kontamination nachweisen, wurden die Waschschritte wiederholt und die Apparatur zusätzlich mit NaOH inkubiert. 5. Im Falle einer noch hartnäckigeren Kontamination, wurde die Apparatur auseinander gebaut und die Einzelteile wurden mit NaOH und HCl gereinigt. 6. Waschen mit dest. H₂O.

Die angegebene Resact-Konzentration gibt den im vorangegangenen Experiment eingesetzten Konzentrationsbereich an.

Bei den *Quenched-Flow*-Messungen an *A. amurensis*-Spermien gab es kein Kontaminationsproblem mit Asterosap. Nach einem Experiment reichte es aus, den Messstand gründlich mit H₂O zu spülen, um Asterosap zu entfernen.

3.1.2 *Stopped-Flow*-Messungen

Mit der *Stopped-Flow*-Methode habe ich fluoreszenz-optische Messungen an Spermien durchgeführt, die mit Ca²⁺- oder pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen beladen waren. Dadurch war es erstmals möglich, die Resact-induzierte Änderung der Ca²⁺-Konzentration und des pH-Werts an intakten Spermien zeitlich aufgelöst zu messen.

3.1.2.1 Ca²⁺-Messungen

3.1.2.1.1 Beschreibung des Resact-induzierten Ca²⁺-Signals

In diesem Kapitel wird der Zeitverlauf der Fluoreszenzsignale von Spermien, die mit dem Ca²⁺-Indikator Fluo-4 beladen waren, exemplarisch beschrieben.

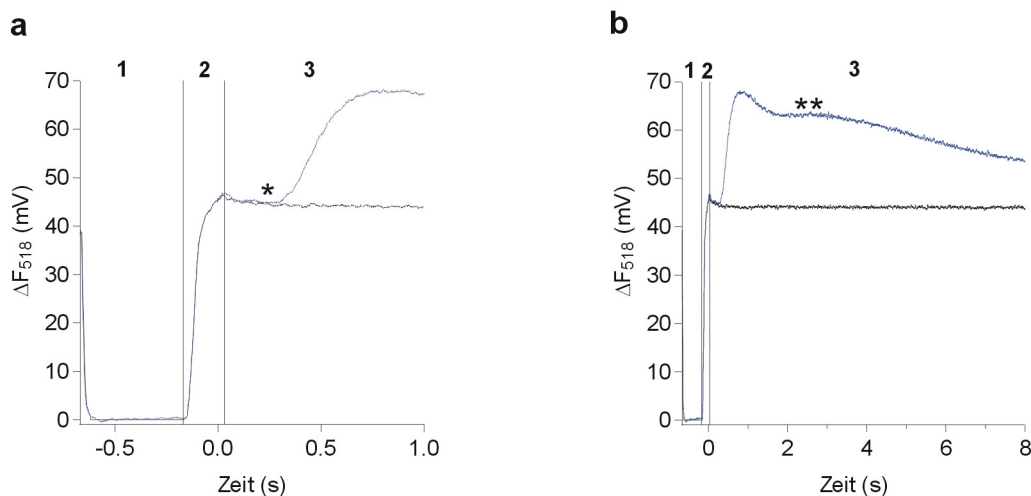


Abb. 3.2: Exemplarische Darstellung eines Resact-induzierten Ca²⁺-Signals. (a) Fluoreszenzsignale von Spermien, die zum Zeitpunkt $t = 0$ mit ASW (schwarze Kurve) oder Resact-haltigem ASW (25pM Endkonzentration Resact; blaue Kurve) gemischt wurden. Der Stern (*) zeigt den Zeitpunkt an, an dem der Wert

der Basalfluoreszenz bestimmt wurde. **(b)** Dieselben Kurven wie (a), aber auf einer längeren Zeitskala. Die zwei Sterne (**) markieren den als „Schulter“ bezeichneten Teil des Signals. Die Fluoreszenzsignale wurden in eine Waschphase (1), eine Stimulationsphase (2) und eine Messphase (3) unterteilt (Details siehe Text).

Abb. 3.2 zeigt die Fluoreszenzsignale von stimulierten Spermien (25 pM Resact; blaue Kurve) und von unstimulierten Spermien (schwarze Kurve) auf verschiedenen langen Zeitskalen. Die Fluoreszenzsignale kann man in drei Phasen unterteilen, die ich als Waschphase (1), Stimulationsphase (2) und Messphase (3) bezeichnet habe. Im folgenden möchte ich die Phasen anhand des Resact-induzierten Fluoreszenzsignals erklären.

Während der Waschphase (1) wird die Messküvette mit Puffer gewaschen, um die Spermien der vorherigen Messung aus der Messküvette zu entfernen. Dadurch fällt die Fluoreszenz zunächst sprunghaft ab (Abb. 3.2a). Wenn die Messküvette nur noch Puffer enthält, ist das Fluoreszenzsignal sehr klein und konstant, oder ganz verschwunden.

Während der Stimulationsphase (2) werden die Spermien mit Resact stimuliert. Dazu werden die Spermien und der Resact-haltige Puffer für 200 ms kontinuierlich durch die Mischkammer und von dort in die Messküvette gepresst. So wird der Wasch-Puffer aus der Messküvette herausgespült und durch die neue Spermien suspension ersetzt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/s. Bei dieser Flussgeschwindigkeit benötigt die Spermien suspension 31 ms von der Mischkammer bis zur Messküvette. Diese Zeit bezeichnet man als Tot-Zeit. Während der Tot-Zeit reagieren die Spermien schon mit Resact, ohne dass das Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Alle Spermien haben also schon 31 ms lang mit Resact reagiert, wenn das Fluoreszenzsignal in der Küvette gemessen wird. Die Tot-Zeit bestimmt also die Zeitauflösung der Methode. Das Fluoreszenzsignal steigt sprunghaft an, sobald die ersten Spermien die Messküvette erreichen. Erst gegen Ende von Phase 2, wenn die Messküvette vollständig mit Spermien gefüllt ist, ist das Fluoreszenzsignal maximal.

Während der Messphase (3) findet die eigentliche Messung statt. Es werden keine weiteren Spermien mehr durch die Messküvette gepresst („Stopped-Flow“), so dass sich der Inhalt der Messküvette nicht mehr ändert. Die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung der Spermien kann zeitlich verfolgt werden. Auf Grund der Tot-Zeit sind die Spermien zu Beginn von Phase 3 schon 31 ms lang mit Resact stimuliert worden. Der eigentliche Zeitpunkt der Resact-Stimulation liegt daher schon in Phase 2 und ist in der Abbildung als Zeitpunkt $t = 0$ angegeben.

In stimulierten sowie in unstimulierten Spermien nimmt innerhalb der ersten $\sim 0,2$ s von Phase 3 die Fluoreszenz geringfügig um etwa 2 mV ab. Danach bleibt das Fluoreszenzsignal in

unstimulierten Spermien konstant (Abb. 3.2a; schwarze Kurve). Diese Fluoreszenzabnahme hängt von der Anwesenheit von Spermien ab, da man keine Fluoreszenzabnahme beobachtet, wenn man eine Spermien-freie, Ca^{2+} -haltige Fluo-4-Lösung mit einer Pufferlösung mischt (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für die Fluoreszenzabnahme ist unbekannt. Unter 3.1.2.1.2 wird gezeigt, dass die Fluoreszenzabnahme jedoch nicht auf einer Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration beruht.

In stimulierten Spermien steigt das Signal nach einer Latenz-Zeit von $\sim 0,3$ s deutlich an und erreicht innerhalb von weiteren $\sim 0,5$ s sein Maximum (Abb. 3.2a; blaue Kurve). Nachdem das Signal ein Maximum erreicht hat, nimmt es ab (Abb. 3.2b). Diese Abnahme ist durch eine „Schulter“ charakterisiert (in Abb. 3.2b mit ** markiert), von der das Signal langsam weiter abnimmt. Diese Schulter kann in ihrer Ausprägung und Form variieren. Im nächsten Kapitel werde ich zeigen, dass es sich bei dem transienten Fluoreszenzanstieg um eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration handelt.

Ich bezeichne den Wert der Fluoreszenz unmittelbar vor dem Resact-induzierten Fluoreszenzanstieg als Basalfluoreszenz (in Abb. 3.2a mit * markiert). Die Basalfluoreszenz hängt von der Spermiedichte, der intrazellulären Fluo-4-Konzentration und von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ab; Sie variierte zwischen ~ 20 mV und 80 mV (bei 600 V Spannung an der Photomultiplier-Röhre).

Aus dem Experiment kann man drei Schlussfolgerungen ziehen:

1. Der Anstieg der Fluoreszenz in stimulierten Spermien während Phase 3 ist ein Resact-induziertes Signal.
2. Die geringe Fluoreszenzabnahme innerhalb der ersten $\sim 0,2$ s von Phase 3 ist nicht Resact-induziert.
3. Die Tot-Zeit ist wesentlich kürzer als die Latenz-Zeit der Resact-induzierten Fluoreszenzänderung. Deshalb kann man die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung vollständig verfolgen.

In den folgenden Abbildungen werden die Fluoreszenzsignale auf eine einfachere Art dargestellt.

1. Die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung wird ab dem Zeitpunkt $t = 0$ gezeigt.
2. Der Wert der Basalfluoreszenz wurde vom Originalsignal subtrahiert, sodass nur die Basislinie und die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung zu sehen sind.

3.1.2.1.2 Das Resact-induzierte Fluoreszenzsignal zeigt eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an

Zwei Kontrollexperimente sollten prüfen, ob die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung auf einer Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beruht. Bei dem ersten Kontrollexperiment wurden die Spermien zusätzlich zu Fluo-4 mit dem zellpermeablen, nicht-fluoreszierenden AM-Ester des Ca^{2+} -Puffers BAPTA beladen und dann mit 12,5 pM Resact stimuliert (Abb. 3.3).

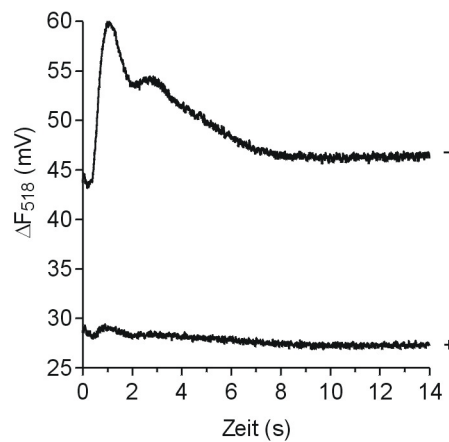


Abb. 3.3: Resact-induzierte Ca^{2+} -Signale von Spermien mit bzw. ohne intrazellulärem BAPTA. Spermien wurden mit Fluo-4 und mit (+) bzw. ohne (-) 300 μM BAPTA-AM beladen. Die Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 12,5 pM Resact stimuliert. Bei den Signalen handelt es sich um Originalsignale, d.h. der Wert der Basalfluoreszenz wurde nicht vom Signal subtrahiert.

Die Abbildung zeigt die Resact-induzierten Fluoreszenzsignale mit bzw. ohne BAPTA. Während man ohne BAPTA die typische Form einer Resact-induzierten Fluoreszenzänderung sieht, wird mit BAPTA die Fluoreszenzänderung nahezu vollständig unterdrückt. Außerdem nimmt durch BAPTA der Wert der Basalfluoreszenz um ~ 15 mV ab (von 43,5 mV auf 28,5 mV). Die gleiche Wirkung von BAPTA wurde beobachtet, wenn man die Spermien mit 125 pM Resact stimulierte (Daten nicht gezeigt).

Durch die Ca^{2+} -Pufferwirkung von BAPTA wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Änderung „gepuffert“. Aus diesem Grund ist die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung nur noch sehr klein. Das

Experiment zeigt, dass die Fluoreszenzänderung auf einer Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beruht.

Unter 3.1.2.1.1 wurde beschrieben, dass sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Spermien die Fluoreszenz innerhalb der ersten $\sim 0,2$ s geringfügig abnimmt. Diese Fluoreszenzabnahme beobachtet man auch bei BAPTA-beladenen Spermien. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Fluoreszenzabnahme nicht eine Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration anzeigt.

Das Experiment mit BAPTA erlaubt nicht, zwischen einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Medium und einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern zu unterscheiden. Deshalb untersuchte ich die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung in Ca^{2+} -freiem ASW (Ca^{2+} -Konzentration $< 1 \mu\text{M}$). Dazu wurden Spermien in ASW im Volumenverhältnis 1:1 mit 0CaASW gemischt. 0CaASW enthält nominal kein Ca^{2+} , aber 11 mM EGTA.

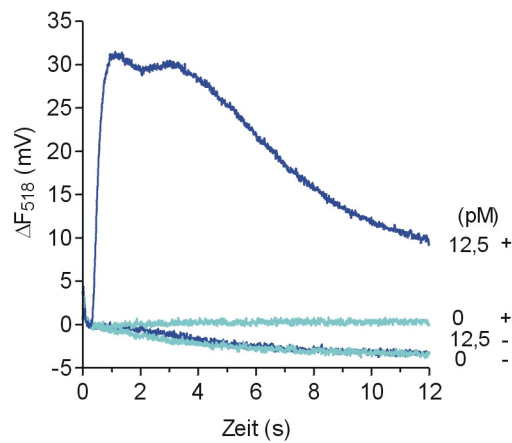


Abb. 3.4: Resact-induzierte Ca^{2+} -Signale mit bzw. ohne extrazellulärem Ca^{2+} . Fluo-4-beladene Spermien in ASW wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ in gleichen Teilen mit 0CaASW (-) oder ASW (+) gemischt. Die Spermien wurden ohne (türkise Kurven) oder mit 12,5 pM Resact (blaue Kurven) stimuliert.

Abb. 3.4 zeigt die Fluoreszenzsignale von stimulierten (12,5 pM Resact; blaue Kurven) und unstimulierten (türkise Kurven) Spermien in Ca^{2+} -haltigem (+) bzw. Ca^{2+} -freiem (-) ASW. In Ca^{2+} -haltigem ASW zeigen die Fluoreszenzsignale von stimulierten Spermien und von unstimulierten Spermien ihre jeweils typische Form (Abb. 3.4). Dagegen wird in Ca^{2+} -freiem

ASW kein Resact-induzierter Fluoreszenzanstieg beobachtet. Die Fluoreszenz nimmt sogar langsam ab - in stimulierten wie auch in unstimulierten Spermien.

Anhand der Ergebnisse dieses Experimentes interpretiere ich den transienten Verlauf der Resact-induzierten Fluoreszenzänderung in Ca^{2+} -haltigem ASW wie folgt:

Der Fluoreszenzanstieg beruht darauf, dass durch Resact Ca^{2+} -Kanäle geöffnet werden: Ca^{2+} strömt in die Spermien. Die anschließende Fluoreszenzabnahme beruht darauf, dass die Ca^{2+} -Kanäle schließen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder Ca^{2+} -ATPasen aktiviert werden, die Ca^{2+} aus den Spermien transportieren.

Die langsame Fluoreszenzabnahme in Ca^{2+} -freiem ASW interpretiere ich so, dass sich in Ca^{2+} -freiem Medium langsam eine niedrigere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration einstellt, die wahrscheinlich durch die Aktivität eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers oder einer Ca^{2+} -ATPase vermittelt wird.

3.1.2.1.3 Werden die Messsignale durch den Mischvorgang beeinträchtigt?

Die Spermien werden beim Mischen in der *Stopped-Flow*-Apparatur mit Resact-haltigem ASW Scherkräften ausgesetzt, die mit der Flussgeschwindigkeit zunehmen. Es sollte untersucht werden, ob die Flussgeschwindigkeit einen Einfluss auf das Resact-induzierte Fluoreszenzsignal hat. Dazu habe ich Spermien bei Flussgeschwindigkeiten von 1 bis 6 ml/s mit 25 pM Resact stimuliert (Abb. 3.5).

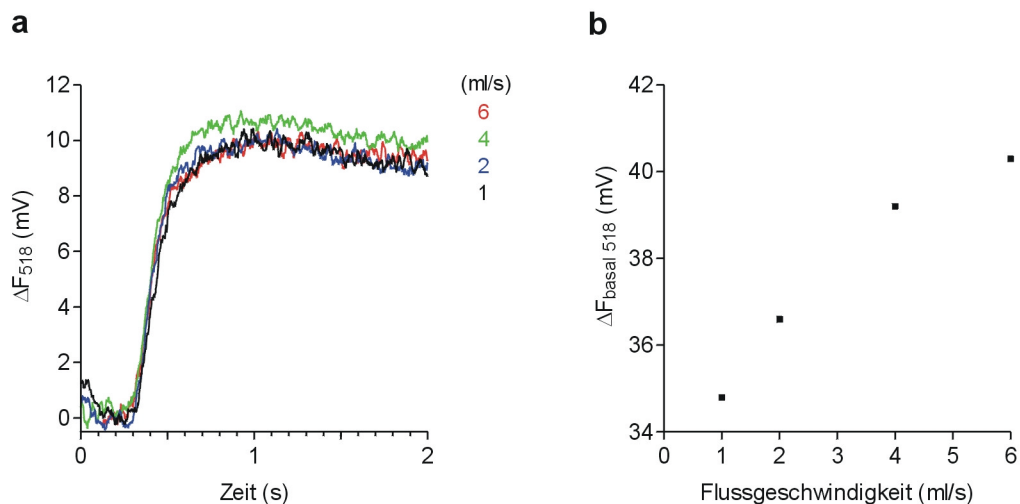


Abb. 3.5: Resact-induziertes Ca^{2+} -Signal bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten. (a) Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurden die Spermien mit 25 pM Resact stimuliert. Die Flussgeschwindigkeiten betrugen 1 bis 6 ml/s und sind in

den Farben der dazugehörenden Kurven angegeben. (b) zeigt die Werte der Basalfluoreszenz von Originalsignalen in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit.

Abb. 3.5a zeigt, dass der Zeitverlauf bzw. die Form der Resact-induzierten Ca^{2+} -Signale unabhängig von der Flussgeschwindigkeit ist. Die geringe Variation der Amplitude wurde auch bei Ca^{2+} -Signalen beobachtet, die bei ein und derselben Flussgeschwindigkeit gemessen worden sind.

In Abb. 3.5b ist der Wert der *Basalfluoreszenz* der Originalsignale in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit gezeigt. Die Spermien sind gleich lang mit Fluo-4 beladen worden. Deshalb sollte die Basalfluoreszenz unabhängig von der Flussgeschwindigkeit sein. Die Basalfluoreszenz steigt jedoch um maximal $\sim 10\%$ mit zunehmender Flussgeschwindigkeit an. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass mit zunehmenden Scherkräften schon während des Mischens entweder Ca^{2+} in die Spermien strömt oder Fluo-4 aus den Spermien in das Ca^{2+} -haltige Medium freigesetzt wird.

Um eine Schädigung der Spermien zu vermeiden, habe ich in allen *Stopped-Flow*-Experimenten - falls nicht anders angegeben - eine Flussgeschwindigkeit von 1 ml/s verwendet.

3.1.2.1.4 Welchen Einfluss hat die Beladungsdauer mit Fluo-4 auf die Form des Ca^{2+} -Signals?

Um den Ca^{2+} -Einstrom messen zu können, müssen die Spermien zunächst mit Fluo-4 beladen werden. Da Fluo-4 die Zellmembran nicht durchdringen kann, wurden die Spermien mit dem membrangängigen Acetoxymethylester des Fluo-4 (Fluo-4AM) inkubiert. Zelleigene unspezifische Esterasen hydrolysieren Fluo-4AM zu Fluo-4, das sich in den Spermien anreichert (zur Übersicht siehe Haugland, 1996).

Das Signal-Rausch-Verhältnis der Fluoreszenzsignale sollte möglichst groß sein. Die Größe des Signal-Rausch-Verhältnisses hängt von der Signalamplitude und damit von der intrazellulären Fluo-4-Konzentration ab. Die intrazelluläre Fluo-4-Konzentration nimmt mit der Beladungsdauer zu; es erscheint deshalb sinnvoll, die Spermien möglichst lange zu beladen. Durch die Hydrolyse von Fluo-4AM wird jedoch der Acetoxymethoxylester freigesetzt, der zytotoxisch auf die Spermien wirken könnte. Des Weiteren könnten hohe intrazelluläre Fluo-4-Konzentrationen den Ca^{2+} -Haushalt der Spermien verändern, da Fluo-4 als Ca^{2+} -Puffer wirkt. Ein veränderter Ca^{2+} -Haushalt könnte die Reaktion der Spermien auf Resact verändern. Aus

diesen Gründen war es wichtig, die Beladungsdauer zu ermitteln, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis groß ist, die Spermien jedoch noch nicht durch die Beladung mit Fluo-4 beeinträchtigt werden.

Deshalb untersuchte ich zunächst, wie schnell sich Fluo-4 in Spermien anreichert. Hierzu wurden die Spermien unterschiedlich lang mit Fluo-4AM inkubiert und anschließend mit dem Detergenz TritonX-100 lysiert. Da Fluo-4AM im Vergleich zu Fluo-4 nur schwach fluoresziert, konnte die Fluo-4-Konzentration des Lysats fluorimetrisch bestimmt werden, ohne dass Fluo-4AM aus dem Medium entfernt werden musste. In Abb. 3.6a wird das Ergebnis dieser Messungen dargestellt.

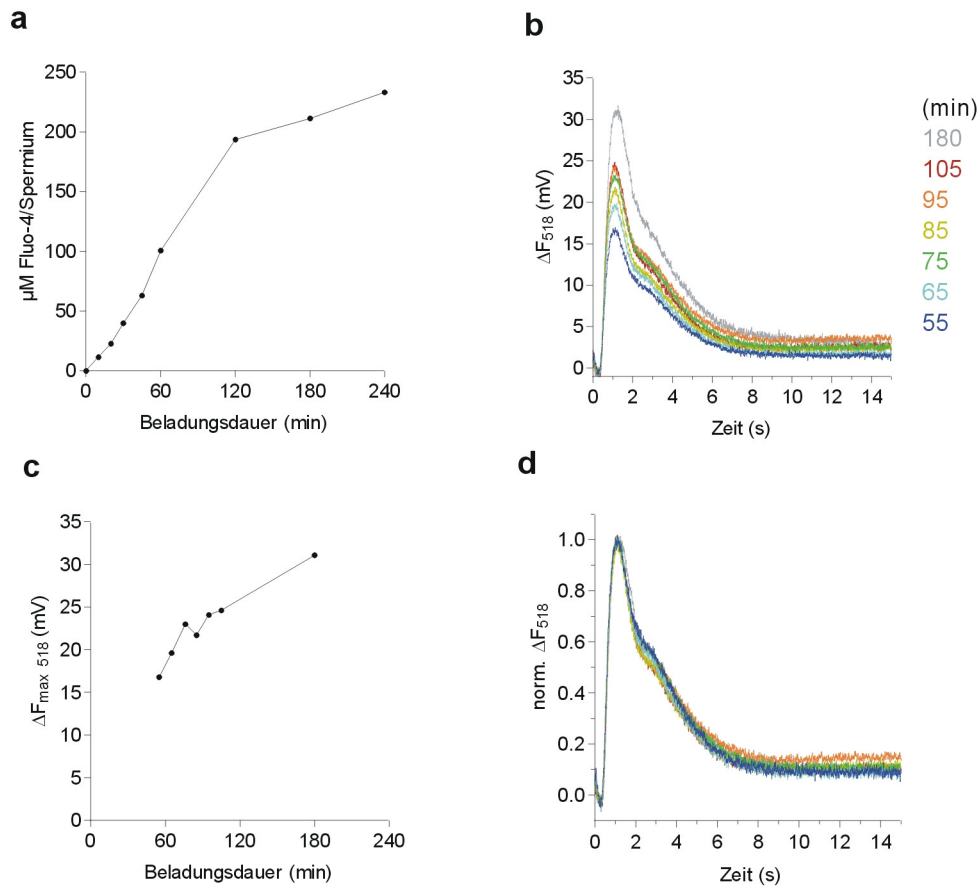


Abb. 3.6: Intrazelluläre Fluo-4-Konzentration und Resact-induziertes Ca^{2+} -Signal in Abhängigkeit von der Beladungsdauer mit Fluo-4AM. (a) Die Spermien wurden unterschiedlich lang mit Fluo-4AM inkubiert. Danach wurden die Zellen mit TritonX-100 lysiert und die intrazelluläre Fluo-4 Konzentration wurde bestimmt. Der Graph zeigt die Fluo-4-Konzentration in Abhängigkeit von der Beladungsdauer. (b) Nach unterschiedlich langer Beladungsdauer wurden die Spermien mit 12,5 pM Resact stimuliert. Die Beladungsdauer ist in der Farbe der

dazugehörigen Kurven angegeben. In (c) ist die maximale Signalamplitude gegen die Beladungsdauer aufgetragen. (d) Die Normierung der Ca^{2+} -Signale auf die maximale Signalamplitude erlaubt den Vergleich der Form nach unterschiedlich langer Beladungsdauer.

Abb. 3.6a zeigt, dass die intrazelluläre Fluo-4-Konzentration über 2 h kontinuierlich auf etwa 200 μM ansteigt. Danach beginnt die Fluo-4-Konzentration zu sättigen.

Als nächstes untersuchte ich, wie sich die Form der Resact-induzierten Ca^{2+} -Signale mit der Beladungsdauer verändert. Dazu wurden die Spermien unterschiedlich lang mit Fluo-4 beladen und anschließend mit 12,5 pM Resact stimuliert. Abb. 3.6b zeigt, dass mit der Beladungsdauer die Amplitude der Ca^{2+} -Signale größer wird. Dies wird besonders deutlich, wenn man die maximalen Signalamplituden gegen die Beladungsdauer aufträgt (Abb. 3.6c). Werden die Ca^{2+} -Signale auf die maximale Signalamplitude normiert, lässt sich die Form der Ca^{2+} -Signale nach unterschiedlicher Beladungsdauer vergleichen (Abb. 3.6d). Die Abbildung zeigt, dass sich die Form der Ca^{2+} -Signale nicht mit der Beladungsdauer ändert.

Für alle weiteren Ca^{2+} -Messungen betrug die Beladungsdauer zwischen 45 und 60 min, selten auch bis zu 120 min. Innerhalb dieses Zeitraums war das Signal-Rausch-Verhältnis der Ca^{2+} -Signale groß.

3.1.2.1.5 Welcher Puffer ist am besten für die Beladung der Spermien mit Fluo-4 geeignet?

Andere Arbeitsgruppen (z.B. Schackmann & Chock, 1986; Nishigaki *et al.*, 2001) haben Seeigel-Spermien mit Ca^{2+} -Indikatoren in modifiziertem ASW beladen. Die Ca^{2+} -Konzentration des modifizierten ASW betrug 1 mM und der pH-Wert der Lösung lag bei 7,0 (ASW7,0L). Der geringere pH-Wert verringert die Motilität der Spermien und damit ihren Stoffwechsel (Bracho *et al.*, 1997). Dadurch sollte es möglich sein, die Spermien für mehrere Stunden oder sogar über Nacht mit dem Ca^{2+} -Indikator zu beladen (mündliche Mitteilung A. Darszon). Meine Experimente zeigen, dass eine Inkubationszeit von ~ 1 h mit Fluo-4AM ausreicht (3.1.2.1.4). Bei einer so kurzen Inkubationszeit ist es nicht notwendig die Spermien in ASW bei pH7,0 zu beladen. Die niedrigere Ca^{2+} -Konzentration in ASW7,0L wurde damit begründet, dass sich im Vergleich zu normalem ASW die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration der Spermien selbst bei einer langen Beladung nicht erhöht. Dadurch sollen die Eizellpeptid-induzierte Ca^{2+} -Signale groß werden (mündliche Mitteilung A. Darszon).

Ein Kontrollexperiment sollte Aufschluss darüber geben, ob das Ca^{2+} -Signal von dem Beladungspuffer – ASW versus ASW7,0L – abhängt. Dazu wurden Spermien für 1 h entweder in ASW oder in ASW7,0L mit Fluo-4 beladen, anschließend 20-fach mit ASW verdünnt und dann mit verschiedenen Resact-Konzentrationen stimuliert (Abb. 3.7).

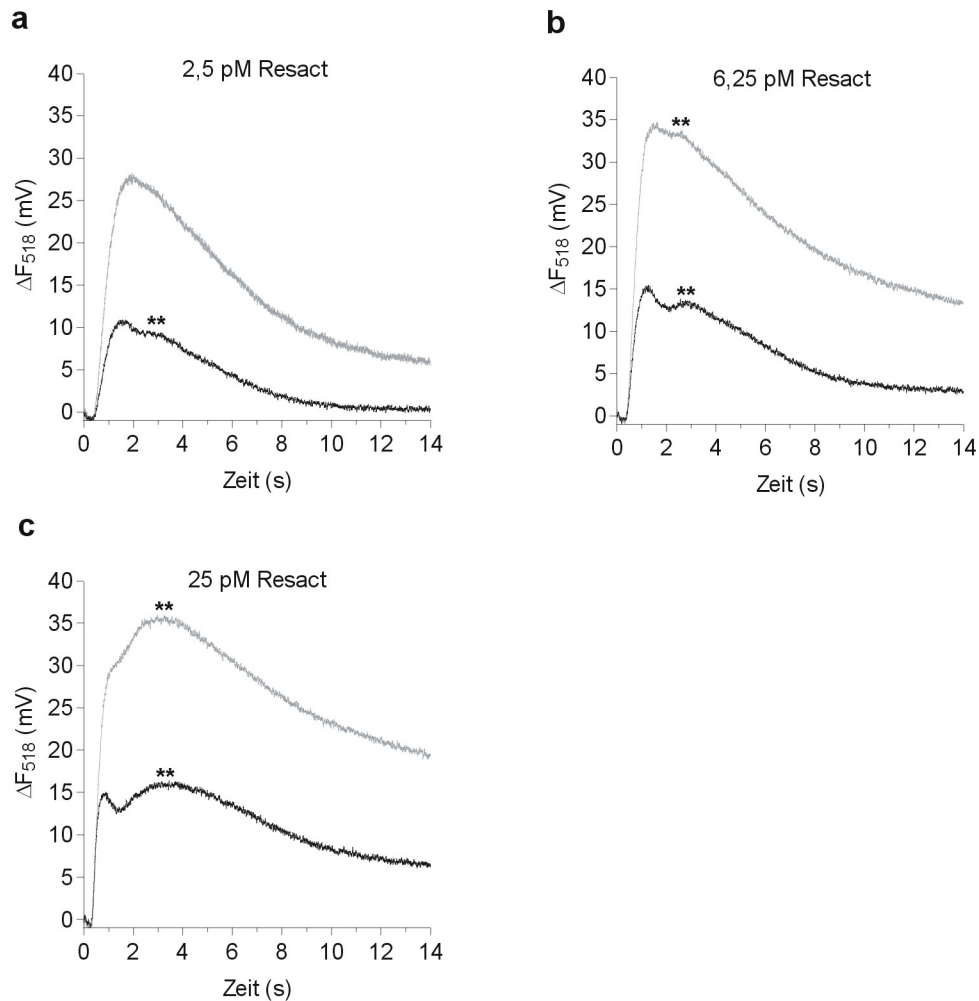


Abb. 3.7: Resact-induziertes Ca^{2+} -Signal von Spermien, die in ASW oder ASW7,0L beladen wurden. Die Spermien wurden mit Fluo-4AM inkubiert. Die eine Hälfte der Spermienstamm suspension wurde in ASW7,0L (graue Kurven) und die andere Hälfte in ASW (schwarze Kurven) inkubiert. Die Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 2,5 pM (a), 6,25 pM (b) und 25 pM Resact (c) stimuliert. Die zwei Sterne (**) markieren den als „Schulter“ bezeichneten Teil des Signals.

Die Resact-induzierten Ca^{2+} -Signale von Spermien, die in ASW7,0L beladen wurden, sind mehr als doppelt so groß wie nach der Beladung in ASW. Außerdem hängt die Form der Ca^{2+} -Signale von dem Beladungspuffer ab. In ASW zeigen die Signale ihre schon bekannte Form, während bei Spermien, die in ASW7,0L beladen wurden, die „charakteristische“ Schulter erst ab einer Resact-Konzentration von 6,25 pM zu erkennen ist (Abb. 3.7 **). In ASW7,0L scheint die Schulter ab Resact-Konzentration $\geq 6,25$ pM zunehmend größer zu werden, so dass zwischen dem ersten Maximum und der Schulter das Signal kaum (6,25 pM) oder nicht mehr abnimmt (25 pM).

Obwohl das Signal-Rausch-Verhältnis etwas besser war, wenn man die Spermien in ASW7,0L beladen hat, verwendete ich ASW, da dieser Puffer den physiologischen Bedingungen am nächsten kommt.

3.1.2.1.6 Ist es notwendig den extrazellulären Indikator nach der Beladung zu entfernen?

Werden Zellen mit dem AM-Ester eines Indikators z.B. Fluo-4 inkubiert (Fluo-4AM), so wird nur ein Bruchteil des Indikators aufgenommen (Haugland, 1996). Das nicht-fluoreszierende Fluo-4AM wird in den Zellen zu Fluo-4 hydrolysiert, das Ca^{2+} -abhängig fluoresziert. *Molecular Probes*, der Hersteller von Fluo-4, empfiehlt den extrazellulären AM-Ester der Indikatoren nach der Beladung zu entfernen. Der extrazelluläre Indikator wird entfernt, indem man die Spermien abzentrifugiert, den Überstand verwirft und das Spermienpellet in „frischem“ ASW ohne Indikator resuspendiert. Durch diesen Waschschrift wird die Beladung gestoppt. Durch den Waschschrift wird auch extrazelluläres Fluo-4 entfernt, das entsteht, wenn Fluo-4AM durch primäre oder sekundäre Amine im Beladungspuffer hydrolysiert wird. Ich habe aber keinen Hinweis, dass unter den Inkubationsbedingungen Fluo-4 im extrazellulären Medium entsteht. Schließlich kann der Indikator schon während der Beladung durch Transporter wieder aus den Zellen in das Medium transportiert werden (Kao, 1994). Auch dieser Mechanismus würde die Fluo-4-Konzentration im Suspensionsmedium – und damit die Basalfluoreszenz erhöhen.

Aus den folgenden Überlegungen schien es jedoch sinnvoll zu sein, den extrazellulären AM-Ester des Indikators nicht zu entfernen:

1. ASW enthält keine Amine. Deshalb kann man davon ausgehen, dass Fluo-4AM nicht hydrolysiert wird.

2. Die Form der Ca^{2+} -Signale hängt nicht von der Beladungsdauer ab (3.1.2.1.4). Deshalb ist es nicht notwendig, die Beladung zu stoppen. Außerdem wird durch die Verdünnung des Beladungsansatzes mit ASW die Fluo-4AM-Konzentration 20-fach reduziert, wodurch die Beladung stark verringert oder ganz unterbunden wird.
3. Die Zentrifugation und die anschließende Resuspension könnten die Spermien schädigen und beanspruchen Zeit.

Ich habe geprüft, ob sich die Resact-induzierten Ca^{2+} -Signale gewaschener und ungewaschener Spermien voneinander unterscheiden (Abb. 3.8).

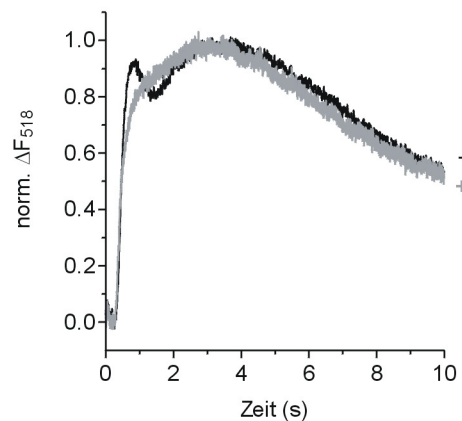


Abb. 3.8: Normalisierte Resact-induzierte Ca^{2+} -Signale mit und ohne extrazellulärem Fluo-4AM. Die Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 25 pM Resact stimuliert. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Ca^{2+} -Signale mit extrazellulärem Fluo-4AM (graue Kurve) bzw. nach Entfernung von Fluo-4AM (schwarze Kurve). Die Ca^{2+} -Signale wurden auf den maximalen Fluoreszenzwert normiert.

Abb. 3.8 zeigt, dass sich die Form der Ca^{2+} -Signale mit und ohne extrazellulärem Indikator nur wenig unterscheiden. Im Vergleich zu ungewaschenen Spermien zeigt das Ca^{2+} -Signal bei gewaschenen Spermien jedoch nur ein einziges Maximum, das mit der Schulter bzw. dem zweiten Maximum ungewaschener Spermien zeitlich zusammenfällt. Die Ca^{2+} -Signale gewaschener und ungewaschener Spermien klingen nach Erreichen der Schulter gleich schnell ab.

Dieses Experiment zeigt, dass der Waschschrift die Form des Ca^{2+} -Signals etwas verändert. Deshalb wurde in den Experimenten auf den Waschschrift verzichtet.

3.1.2.1.7 Ändert sich die Form des Ca^{2+} -Signals während eines Experiments?

Ein typisches Experiment, bei dem die Ca^{2+} -Signale nach Stimulation mit verschiedenen Resact-Konzentrationen gemessen werden, läuft wie folgt ab:

Die Fluo-4-beladenen Spermien werden 20-fach mit ASW verdünnt. Von der verdünnten Spermiesuspension werden 100 μl für die Messung eines Ca^{2+} -Signals benötigt. Da im Verlauf eines Experimentes ~ 30 Ca^{2+} -Signale aufgenommen wurden, wurden ~ 3 ml der verdünnten Spermiesuspension in eine Spritze der *Stopped-Flow*-Apparatur gefüllt. Abhängig von der Messzeit pro Ca^{2+} -Signal (meistens bis zu 30 s), dauerte das gesamte Experiment bis zu ~ 30 min. Deshalb befanden sich die Spermien unterschiedlich lange als verdünnte Suspension in der Spritze („Spermienalter“).

Ich untersuchte, ob sich das Alter der Spermien auf Form und Amplitude der Ca^{2+} -Signale auswirkt, indem ich die Resact-induzierten Ca^{2+} -Signale von unterschiedlich „alten“ Spermien miteinander verglich (Abb. 3.9).

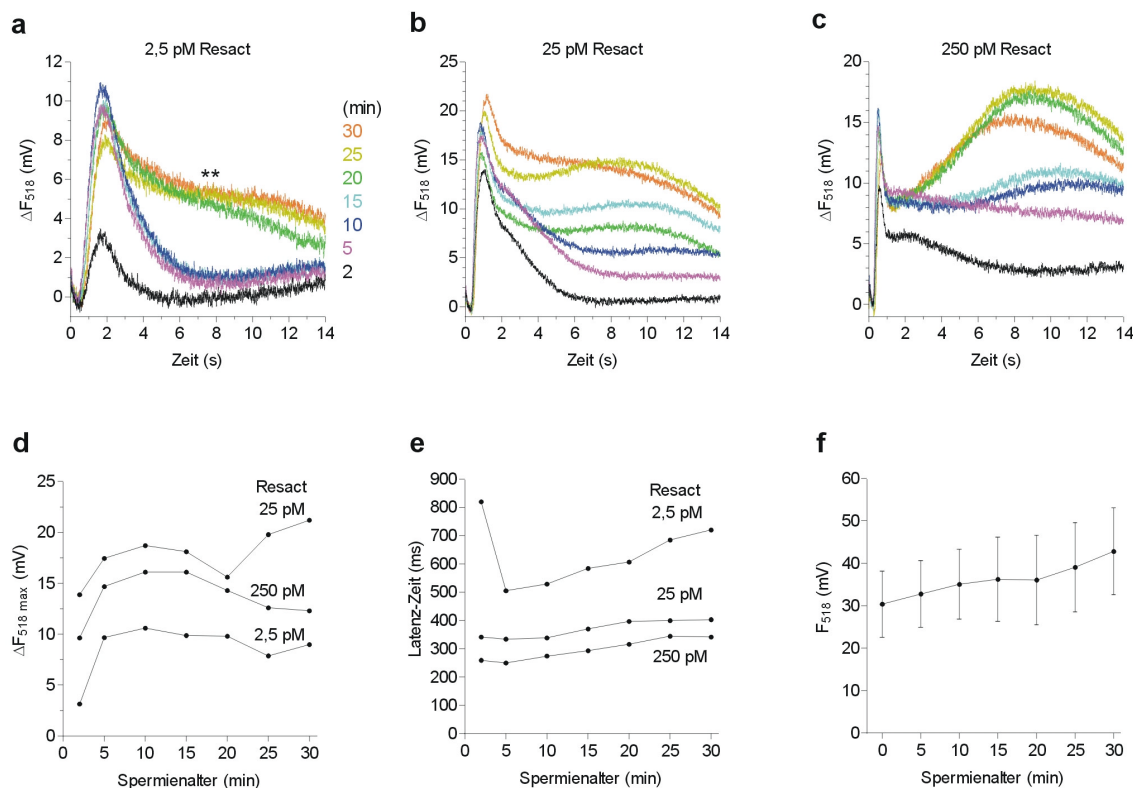


Abb. 3.9: Veränderung des Resact-induzierten Ca^{2+} -Signals im Laufe eines Experiments. Fluo-4-beladene Spermien wurden in die *Stopped-Flow*-Apparatur gefüllt und unterschiedlich lang in der Spritze gelagert. Zum

Zeitpunkt $t = 0$ wurden die Spermien mit 2,5 pM (a), 25 pM (b) und 250 pM Resact (c) stimuliert. Die Farben der Kurven entsprechen den unterschiedlichen Verweildauern (siehe a). Maximale Amplitude (d), Latenz-Zeit (e) und Basalfluoreszenz (f) der Signale aus (a, b, c). Die Fehlerbalken (f) geben die Standardabweichung von den Mittelwerten der Basalfluoreszenzen aus (a, b, c) an. Die zwei Sterne (**) markieren den als „Schulter“ bezeichneten Teil des Signals.

Abb. 3.9a-c zeigt die Ca^{2+} -Signale von Spermien, die zwischen 2 und 30 min alt waren. Des Weiteren zeigt die Abbildung (d-f) die Amplitude, Latenz-Zeit und die Basalfluoreszenz der Ca^{2+} -Signale in Abhängigkeit vom Spermienalter.

Die Form der Ca^{2+} -Signale hängt – unabhängig von der Resact-Konzentration - vom Alter der Spermien ab (Abb. 3.9a-c). Insbesondere verändern sich Geschwindigkeit und Form der Fluoreszenzabnahme nach Erreichen des ersten Maximums. Bei einem Spermienalter von 10 min entwickelt sich bei der Stimulation mit 2,5 pM Resact eine Schulter (**). Bei 25 bzw. 250 pM Resact ist die Schulter von Anfang an vorhanden, sie wandelt sich mit zunehmendem Spermienalter jedoch in ein zweites Maximum. Sind die Spermien älter als 20 min, so ist bei Stimulation mit 250 pM Resact das zweite Maximum sogar größer als das erste Maximum.

Die Signalamplituden sind - unabhängig von der Resact-Konzentration – am Anfang des Experiments am kleinsten, d.h. wenn die Spermien nur 2 min alt sind. Innerhalb der nächsten 3 min steigt die Amplitude an (Abb. 3.9d). Während der nächsten 15 min bleibt die Amplitude annähernd konstant, um danach entweder abzunehmen (250 pM Resact), zuzunehmen (25 pM Resact) oder weiterhin annähernd konstant zu bleiben (2,5 pM Resact). Die Latenz-Zeit verkürzt sich bei 2,5 pM Resact innerhalb der ersten 5 min stark (Abb. 3.9e). Mit zunehmendem Spermienalter wird die Latenz-Zeit aber wieder etwas größer. Bei 25 und 250 pM Resact bleibt die Latenz-Zeit während des ganzen Experiments annähernd gleich. Die Basalfluoreszenz nimmt ebenfalls im Laufe des Experiments kontinuierlich zu (Abb. 3.9 f).

Die Veränderungen des Ca^{2+} -Signals innerhalb der ersten 5 min sind vielleicht auf Inhaltsstoffe im *dry-sperm* zurückzuführen. Während der Fluo-4-Beladung der Spermien liegen diese Inhaltsstoffe noch in relativ hoher Konzentration vor. Durch die 20-fache Verdünnung nach der Beladung könnte die Konzentration der Inhaltsstoffe so weit abgesenkt werden, dass sie nicht mehr wirksam sind. Dadurch könnten Prozesse aktiviert werden, welche die Spermienphysiologie und damit auch das Ca^{2+} -Signal beeinflussen. Die Ursachen für die Veränderung der Form während der folgenden 25 min sind unbekannt.

Da die Ca^{2+} -Signale von 5 – 20 min alten Spermien, am wenigsten variieren, habe ich die Ca^{2+} -Signale in diesem Zeitraum gemessen.

3.1.2.1.8 Ändern sich Form und Amplitude der Ca^{2+} -Signale im Laufe der Laichzeit?

Es sollte untersucht werden, ob sich die Resact-induzierten Ca^{2+} -Signale im Laufe der Laichzeit (Mai bis September) ändern. Abb. 3.10 zeigt Amplitude, Latenz-Zeit und Steigung von Ca^{2+} -Signalen, die durch 6,25 pM Resact ausgelöst wurden.

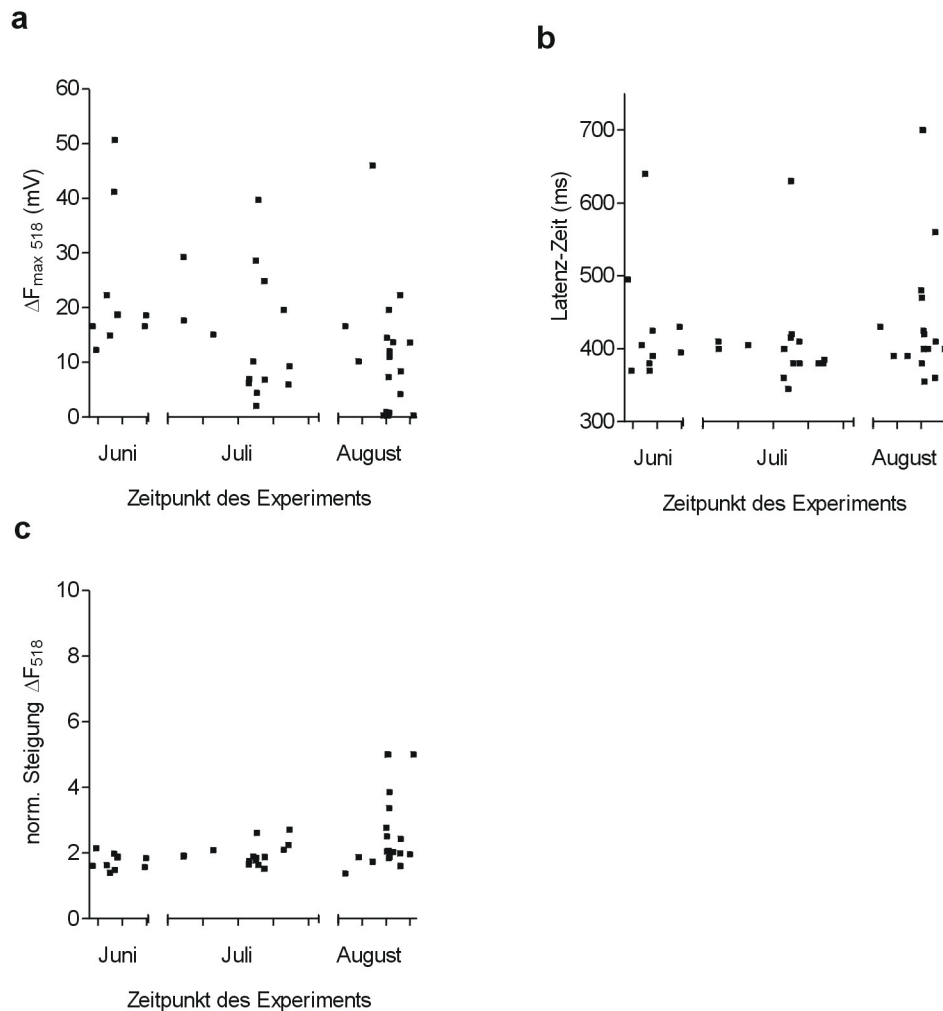


Abb. 3.10: Amplitude, Latenz-Zeit und Steigung des Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstroms im Verlauf der Laichzeit. Maximale Amplitude (a), Latenz-Zeit (b) und auf die maximale Amplitude normalisierte Steigung (c) von Ca^{2+} -Signalen während der Laichzeit. Bei 7 Ca^{2+} -Signalen, die Mitte August gemessen wurden, betrug die maximale Amplitude zwischen 0 und 2 mV.

Trägt man die Amplitude der Ca^{2+} -Signale in Abhängigkeit vom Datum der Messung auf, so sieht man, dass die Amplituden bis Mitte August ohne erkennbare Tendenz zwischen 2 und 51

mV variieren (Abb. 3.10a). Nach Mitte August induzierte Resact bei 8 von 17 Messungen keinen oder nur einen sehr kleinen Ca^{2+} -Einstrom ($< 5 \text{ mV}$). Die Latenz-Zeit und die normalisierte Steigung variieren bis Mitte August kaum (Abb. 3.10b, c). Ab Mitte August wurden bei den beiden Parametern auch größere Werte bestimmt. Diese Werte wurden an den Signalen mit sehr kleinen Amplituden bestimmt. Eine Ursache dafür, dass die Werte groß sind, ist nicht bekannt.

Die große Variation der Amplitude ist teilweise darauf zurückzuführen, dass Suspensionen mit unterschiedlicher Spermiedichte eingesetzt worden sind. Die Variation beruht vermutlich auch darauf, dass die Spermien von Tier zu Tier unterschiedlich empfindlich auf Resact reagieren. Die sehr kleinen Ca^{2+} -Signale ab Mitte August beruhen vermutlich darauf, dass die Laichzeit dem Ende zugeht. Am Ende der Laichzeit könnten in den Seeigeln Prozesse aktiviert werden, welche die physiologischen Eigenschaften der Spermien, wie z.B. den Ca^{2+} -Einstrom, verändern.

Wenn die Amplituden der Ca^{2+} -Signale $< 5 \text{ mV}$ waren (6,25 pM Resact), wurde die Spermiesuspension nicht für weitere Messungen verwendet und die bereits gemessenen Signale wurden nicht weiter ausgewertet. Da die Form der Ca^{2+} -Signale von Mai bis August sehr ähnlich ist (Daten nicht gezeigt), wurde das Datum an dem die Ca^{2+} -Signale gemessen wurden, bei der Auswertung der Signale nicht berücksichtigt.

3.1.2.1.9 Wie reproduzierbar sind hintereinander gemessene Ca^{2+} -Signale?

Falls nicht anders angegeben, stellen die gezeigten Ca^{2+} -Signale immer den Mittelwert aus 3 bis 4 hintereinander gemessenen Signalen dar. Besonders bei kleinen Ca^{2+} -Signalen ist es vorteilhaft mehrere Signale zu mitteln. Das Signal-Rausch-Verhältnis vergrößert sich nämlich mit der Wurzel der Anzahl der gemittelten Signale. Abhängig von der Messzeit pro Ca^{2+} -Signal benötigt man $\sim 2 \text{ min}$ um 3 bis 4 Ca^{2+} -Signale aufzunehmen. Unter 3.1.2.1.7 wurde gezeigt, dass sich die Form der Ca^{2+} -Signale innerhalb der 2 min nicht systematisch ändert. In diesem Kapitel soll untersucht werden, wie reproduzierbar Form und Amplitude der einzelnen Ca^{2+} -Signale sind, aus denen anschließend der Mittelwert berechnet wurde. Dazu wurden vier hintereinander gemessene Ca^{2+} -Signale miteinander verglichen (25 pM Resact; Abb. 3.11). Abb. 3.11 zeigt, dass die einzelnen Ca^{2+} -Signale praktisch gleich sind. Der ebenfalls abgebildete Mittelwert (schwarze Kurve) zeigt, dass das Signal-Rausch-Verhältnis - wie zu erwarten - durch das Mitteln verbessert wird.

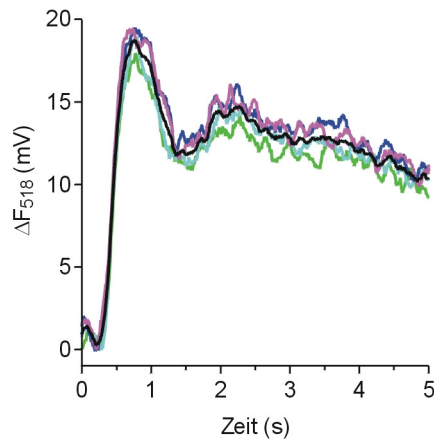


Abb. 3.11: Zeitverlauf einzelner Ca^{2+} -Signale und des gemittelten Ca^{2+} -Signals. Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 25 pM Resact stimuliert. Dargestellt ist sowohl der Zeitverlauf der einzelnen Signale (farbige Kurven), als auch der des gemittelten Ca^{2+} -Signals (schwarze Kurve).

3.1.2.2 pH-Messungen

3.1.2.2.1 Beschreibung des Resact-induzierten pH-Signals

Resact induziert in den Spermien einen pH-Anstieg von 7,25 auf 7,34 (Schackmann & Chock, 1986). Um den pH-Anstieg mit der *Stopped-Flow*-Methode zeitlich aufgelöst messen zu können, habe ich die Spermien mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF beladen. In diesem Kapitel wird die Form der Fluoreszenzsignale von BCECF-beladenen Spermien exemplarisch beschrieben. Wie schon unter 3.1.2.1.1 erläutert, kann man die Messsignale in eine Waschphase, eine Stimulationsphase und eine Messphase unterteilen. Da der Zeitverlauf des Signals während der Waschphase und der Stimulationsphase bei pH-Messungen und Ca^{2+} -Messungen gleich ist, werde ich nur die Messphase der pH-Signale beschreiben.

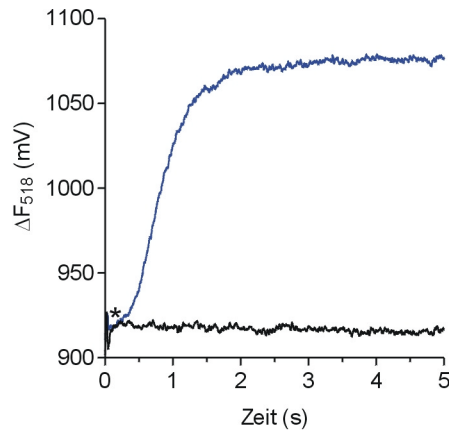


Abb. 3.12: Exemplarische Darstellung eines Resact-induzierten pH-Signals. Fluoreszenzsignale von Spermien, die zum Zeitpunkt $t = 0$ ohne (schwarze Kurve) oder mit 25 pM Resact (blaue Kurve) stimuliert wurden. Der Stern (*) zeigt den Zeitpunkt an, an dem der Wert der Basalfluoreszenz bestimmt wurde.

Abb. 3.12 zeigt Fluoreszenzsignale von stimulierten Spermien (25 pM Resact; blaue Kurve) und von unstimulierten Spermien (schwarze Kurve). In unstimulierten Spermien bleibt die Fluoreszenz praktisch konstant. Bei stimulierten Spermien steigt das Fluoreszenzsignal nach einer Latenz-Zeit von $\sim 0,3$ s deutlich an und erreicht innerhalb von weiteren ~ 2 s einen maximalen Wert, auf dem das Signal während der restlichen Messdauer verweilt.

Aus diesem Experiment kann man schließen, dass der Fluoreszenzanstieg in stimulierten Spermien ein Resact-induziertes Signal ist. Im nächsten Kapitel werde ich zeigen, dass es sich bei dem Fluoreszenzanstieg um eine Änderung des intrazellulären pH-Werts handelt.

Wie bei den Ca^{2+} -Signalen, bezeichne ich bei den pH-Signalen den Wert der Fluoreszenz *unmittelbar* vor dem Resact-induzierten Fluoreszenzanstieg als Basalfluoreszenz (in Abb. 3.12 mit * markiert). Die Basalfluoreszenz hängt von der Spermiendichte, der intrazellulären BCECF-Konzentration und vom intrazellulären pH-Wert ab. Sie variierte zwischen 0,4 V und 1,6 V (bei einer Spannung von 500 V an der Photomultiplier-Röhre). Um die Fluoreszenzsignale auf einfachere Art darzustellen, wird in den folgenden Abbildungen, wie bei den Ca^{2+} -Signalen, der Wert der Basalfluoreszenz vom Originalsignal subtrahiert. Es wird deshalb nur die Basislinie und die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung zu sehen sein.

3.1.2.2.2 Das Resact-induzierte Fluoreszenzsignal zeigt eine Änderung des pH-Werts an

Mit zwei Kontrollexperimenten prüfte ich, ob die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung auf einer Änderung des intrazellulären pH-Werts beruht. Im ersten Experiment wurden die BCECF-beladenen Spermien in ASW (pH7,5) inkubiert, das den zellpermeablen pH-Puffer Imidazol (20 mM) enthielt, und anschließend mit 6,25 pM Resact stimuliert (Abb. 3.13). Da der pK von Imidazol bei 7,0 liegt, sollte eine Resact-induzierte pH-Änderung gepuffert werden. Ohne eine pH-Änderung sollte sich die Fluoreszenz nicht ändern.

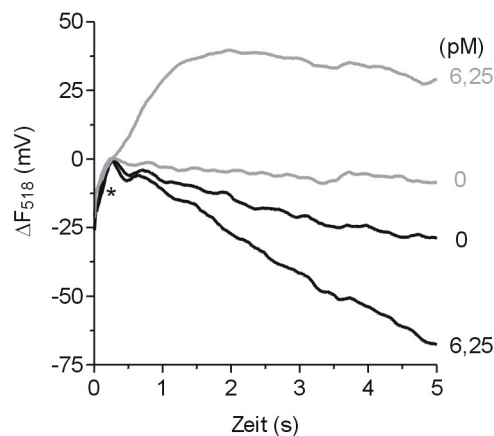


Abb. 3.13: Resact-induzierte Fluoreszenzänderung mit bzw. ohne Imidazol. BCECF-beladene Spermien wurden 5 min mit 20 mM Imidazol inkubiert und zum Zeitpunkt $t = 0$ ohne bzw. mit 6,25 pM Resact und 20 mM Imidazol gemischt (schwarze Kurven). Als Kontrolle wurden BCECF-beladene Spermien ohne Imidazol zum Zeitpunkt $t = 0$ ohne bzw. mit 6,25 pM Resact gemischt (graue Kurven). Die Resact-Konzentrationen sind neben den dazugehörenden Kurven angegeben. Der Stern (*) markiert den Resact-unabhängigen Fluoreszenzanstieg innerhalb der ersten 0,5 s.

Abb. 3.13 zeigt, dass in Resact-stimulierten Spermien mit Imidazol die Fluoreszenz nicht ansteigt, da die Resact-induzierte Alkalisierung in den Spermien durch Imidazol unterbunden wird (schwarze Kurve, 6,25 pM Resact).

Auffällig ist, dass mit Imidazol sowohl in stimulierten Spermien als auch in unstimulierten Spermien die Fluoreszenz während der Messung abnimmt. Die Fluoreszenz nimmt in

stimulierten Spermien schneller ab als in unstimulierten Spermien. Die Fluoreszenz nimmt weniger ab, wenn man geringere Imidazol-Konzentrationen verwendet (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für die Abnahme der Fluoreszenz ist nicht bekannt.

Des Weiteren ist in Abb. 3.13 zu sehen, dass es innerhalb der ersten halben Sekunde zu einem Resact-unabhängigen Fluoreszenzanstieg kommt (in Abb. 3.13 mit * markiert). Dieser Anstieg konnte nur bei einigen Messungen beobachtet werden. Eine Ursache für diesen Anstieg ist nicht bekannt.

In dem zweiten Kontrollexperiment untersuchte ich die Resact-induzierte Fluoreszenzänderung in Anwesenheit von 10 μM des Protonophors FCCP (Abb. 3.14). Diese Substanz führt zu einem Zusammenbruch der Protonengradienten über der Plasma- und Mitochondrienmembran (Tretter *et al.*, 1998). Dadurch wird den intrazellulären Protonen der extrazelluläre Puffer zugänglich, wodurch eine Änderung des pH-Werts unterbunden wird.

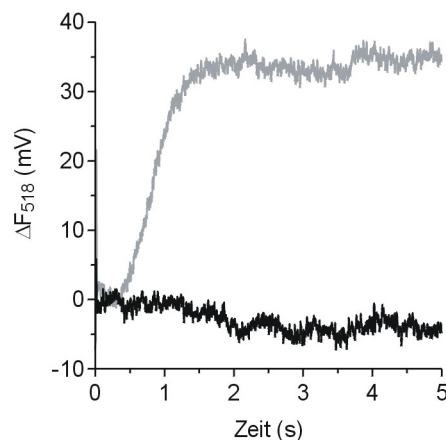


Abb. 3.14: Resact-induzierte Fluoreszenzänderung mit bzw. ohne FCCP. BCECF-beladene Spermien wurden 2 min ohne (graue Kurven) bzw. mit 10 μM FCCP (schwarze Kurven) inkubiert und anschließend zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 6,25 pM Resact stimuliert.

Abb. 3.14 zeigt, dass eine 2 min lange Inkubation mit 10 μM FCCP den Fluoreszenzanstieg vollständig verhindert.

Sowohl mit Imidazol als auch FCCP konnte gezeigt werden, dass es zu keinem Resact-induzierten Fluoreszenzanstieg kommt, wenn man die pH-Änderung unterdrückt. Ich schließe

aus diesen Ergebnissen, dass es sich bei der Resact-induzierten Fluoreszenzänderung um eine Änderung des pH-Werts in den Spermien handelt.

3.1.2.2.3 Wie schnell reichert sich BCECF während der Beladung in den Spermien an?

Um pH-Änderungen messen zu können, müssen die Spermien mit BCECF-AM inkubiert werden. Die Aufnahme von AM-Estern in die Zellen kann erhöht werden, wenn man das Disperganz Pluronic-F-127 dem Beladungspuffer zusetzt (zur Übersicht siehe Haugland, 1996). Wurden Spermien mit BCECF-AM in Anwesenheit von 0,01% bis 0,5% Pluronic-F-127 inkubiert, verbesserte sich die Aufnahme des Indikators nicht (Daten nicht gezeigt). Folglich wurde bei der Inkubation mit BCECF-AM auf Pluronic-F-127 verzichtet.

Das Signal-Rausch-Verhältnis der Messsignale soll möglichst groß sein. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist um so größer, je höher die intrazelluläre BCECF-Konzentration ist. Die Spermien sollten daher so lange mit BCECF inkubiert werden, bis eine möglichst hohe BCECF-Konzentration erreicht wurde. Deshalb untersuchte ich, wie schnell sich BCECF in den Spermien anreichert. Dazu wurden die Spermien unterschiedlich lange mit BCECF-AM inkubiert und anschließend mit dem Detergenz TritonX-100 lysiert. Da BCECF-AM im Vergleich zu BCECF nicht fluoresziert, konnte die BCECF-Konzentration des Lysats fluorimetrisch bestimmt werden, ohne dass BCECF-AM aus dem Medium entfernt werden musste. In Abb. 3.15 ist eine fluorimetrische Messung gezeigt.

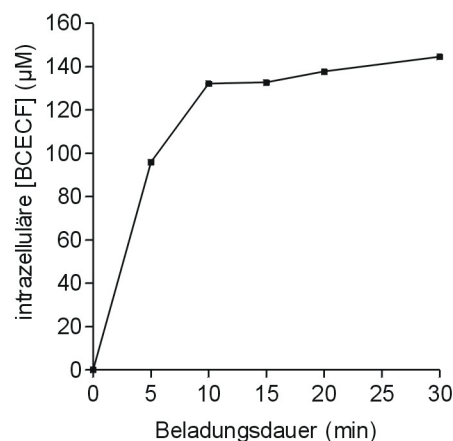


Abb. 3.15: Intrazelluläre BCECF-Konzentration in Abhängigkeit von der Beladungsdauer. Die Spermien wurden unterschiedlich lange mit 10 µM BCECF-AM inkubiert. Danach wurden die Zellen mit TritonX-100 lysiert und die intrazelluläre BCECF-Konzentration wurde bestimmt.

Abb. 3.15 zeigt, dass die intrazelluläre BCECF-Konzentration schon nach 10 min sättigt. Innerhalb dieser Zeit reichert sich die intrazelluläre BCECF-Konzentration um das ~ 15 -fache an. Für die pH-Messungen reichte demnach eine 15 bis 30 min lange Beladung mit BCECF aus, um eine maximale BCECF-Konzentration in den Spermien zu erhalten.

3.1.2.2.4 Werden die pH-Signale durch den Mischvorgang beeinträchtigt?

Wie bei den Ca^{2+} -Messungen (3.1.2.1.3) überprüfte ich auch bei den pH-Messungen, ob die pH-Signale durch den Mischvorgang beeinflusst werden. Dazu wurden die Spermien mit Flussgeschwindigkeiten von 1 bis 6 ml/s mit 125 pM Resact gemischt (Abb. 3.16).

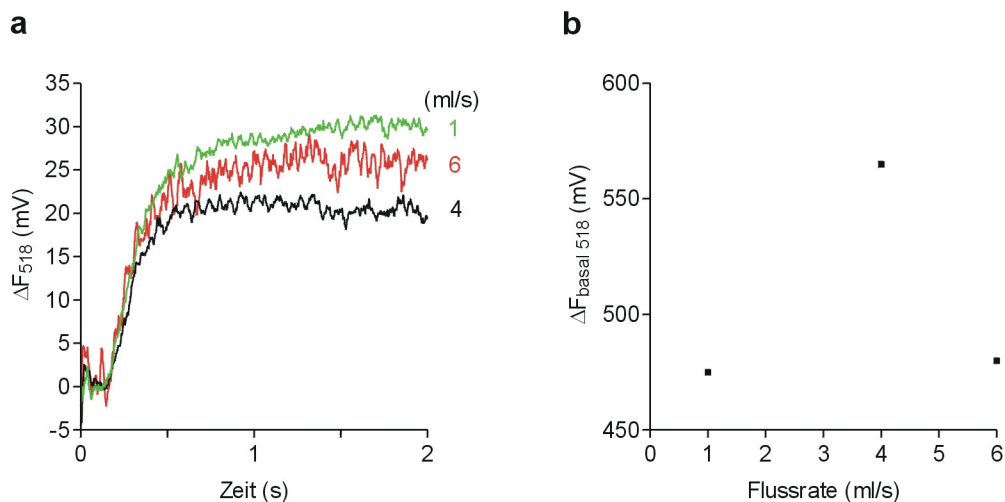


Abb. 3.16: Resact-induziertes pH-Signal bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten. (a) Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurden die Spermien mit 125 pM Resact stimuliert. Die Flussgeschwindigkeiten betrugen 1 bis 6 ml/s und sind in den Farben der dazugehörenden Kurven angegeben. (b) zeigt den Wert der Basalfluoreszenz in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit.

Abb. 3.16a zeigt, dass die Form der pH-Signale weitgehend unabhängig von der Flussgeschwindigkeit ist. Die Variation der Amplitude beruht nicht auf den unterschiedlichen Flussgeschwindigkeit, da die Amplituden auch bei Signalen variieren, die mit der gleichen Flussgeschwindigkeit gemessen wurden. Derartig große Variationen konnten auch bei pH-

Signalen beobachtet werden, die bei derselben Flussgeschwindigkeit gemessen wurden (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 3.16b sind die Werte der Basalfluoreszenz in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit gezeigt. Die Werte sind zwar bei den verschiedenen Flussgeschwindigkeiten unterschiedlich groß, zeigen jedoch keine Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit. Unterschiedliche Werte der Basalfluoreszenz sind auch bei pH-Signalen zu beobachten, die bei derselben Flussgeschwindigkeit gemessen wurden. Die Ursache für die unterschiedlich großen Basalfluoreszenz-Werte ist unbekannt.

Um die Spermien so schonend wie möglich zu behandeln, wurden die pH-Signale in der Regel bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/s gemessen. Die Tot-Zeit betrug bei dieser Flussgeschwindigkeit 31 ms. Bei hohen Resact-Konzentrationen und bei Messung vor Ende der Laichzeit (Details siehe folgendes Kapitel) konnte die Latenz-Zeit der Resact-induzierten pH-Änderung jedoch so kurz sein, dass mit einer Tot-Zeit von 31 ms nicht mehr der gesamte Zeitverlauf der pH-Änderung gemessen werden konnte. Bei diesen Messungen wurden Flussgeschwindigkeiten von bis zu 4 ml/s verwendet; damit erreicht man Tot-Zeiten von bis zu 7,75 ms.

3.1.2.2.5 Ändern sich Form und Amplitude des pH-Signals während eines Experiments bzw. im Lauf der Laichzeit?

Die Form der Resact-induzierten Ca^{2+} -Signale ändert sich während eines Experiments (3.1.2.1.7). In Abb. 3.17 wird gezeigt, wie sich die Form der pH-Signale während eines Experiments ändert. Des Weiteren wird gezeigt, wie die Form der pH-Signale zwischen Experimenten variierte, die in der Mitte (Juni/Juli, Abb. 3.17a, b) und gegen Ende der Laichzeit (August, Abb. 3.17c, d) durchgeführt wurden.

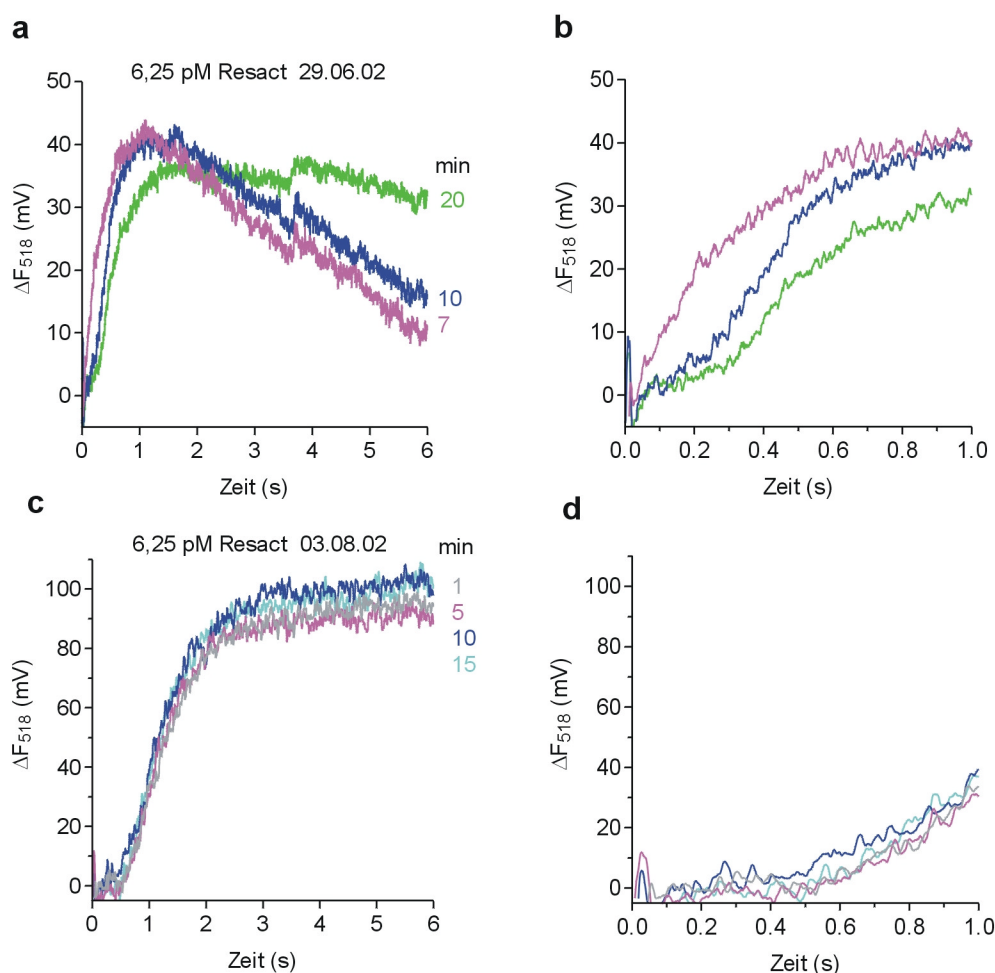


Abb. 3.17: Veränderung der pH-Signale während eines Experiments und im Laufe der Laichzeit. (a, c) BCECF-beladene Spermien wurden in eine Spritze der *Stopped-Flow*-Apparatur gefüllt und nach unterschiedlichen Zeiten mit 6,25 pM Resact zum Zeitpunkt $t = 0$ stimuliert. Die unterschiedlichen Zeiten sind in den Farben der dazugehörigen Kurven angegeben. (b, d) Daten aus (a, c), auf einer längeren Zeitskala gezeigt. Die Experimente wurden in der Mitte (29.06.02; a, b) und gegen Ende (03.08.02; c, d) der Laichzeit durchgeführt.

In der Mitte der Laichzeit steigt der pH-Wert zu Beginn des Experiments schnell (~ 20 ms) nach der Resact-Stimulation an (Abb. 3.17a, b). Nach ~ 1 s erreicht der pH-Wert sein Maximum, um anschließend wieder abzufallen. Im Verlauf des Experiments wird die Latenzzeit des pH-Anstiegs immer größer. Gleichzeitig nimmt der pH-Wert immer langsamer ab, nachdem er das Maximum erreicht hat. Bei einigen pH-Signalen, die gegen Mitte der Laichzeit gemessen wurden, änderte sich jedoch nur die Anstiegsgeschwindigkeit mit dem Alter der Spermien, während die restliche Form nahezu konstant blieb (Daten nicht gezeigt). In wiederum anderen Experimenten konnte man beobachten, dass sofort nach der Stimulation der

Spermien das Fluoreszenzsignal kurz abnahm, um erst anschließend anzusteigen (Daten nicht gezeigt). Die Ursachen für die Variabilität der pH-Signale sind nicht bekannt.

Gegen Ende der Laichzeit verändert sich die Form der pH-Signale während eines Experiments nicht. Nach einer $\sim 0,5$ s langen Latenz-Zeit steigt der pH-Wert an und erreicht nach ~ 2 s sein Maximum. Anschließend bleibt der pH-Wert nahezu konstant. Auffällig ist auch, dass die Signalamplitude am Ende der Laichzeit mehr als doppelt so groß ist wie in der Mitte der Laichzeit.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die Form der pH-Signale nicht nur im Laufe der Laichzeit ändert, sondern in der Mitte der Laichzeit auch während eines Experiments. Gegen Ende der Laichzeit bleibt die Form der pH-Signale allerdings während eines Experiments konstant.

Da die Form der pH-Signale nur gegen Ende der Laichzeit konstant war, wurden nur die kinetischen Parameter dieser Signale ausgewertet.

3.1.2.2.6 Wie reproduzierbar sind hintereinander gemessene pH-Signale?

Wie bei den Ca^{2+} -Messungen (3.1.2.1.9), sollte auch bei den pH-Messungen untersucht werden, wie reproduzierbar hintereinander gemessene Signale sind. Abb. 3.18 zeigt sowohl den Zeitverlauf von drei hintereinander gemessenen Signalen (farbige Kurven), als auch das daraus gemittelte Signal (schwarze Kurve). Die Form und die Amplitude der einzelnen pH-Signale sind praktisch identisch. Dementsprechend wurde durch das Mitteln nur das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert.

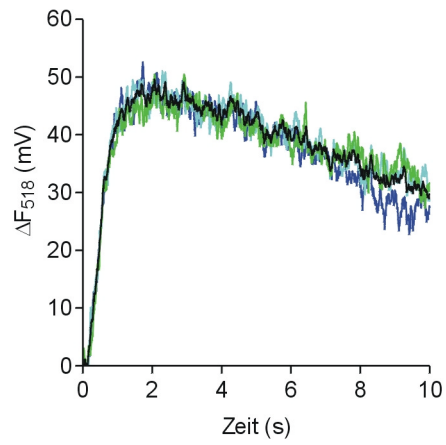


Abb. 3.18: Zeitverlauf einzelner pH-Signale und des gemittelten pH-Signals. Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 2,5 pM Resact stimuliert. Dargestellt ist sowohl der Zeitverlauf der einzelnen Signale (farbige Kurven), als auch der des gemittelten Signals (schwarze Kurve).

3.2 Zeitverlauf der SAP-induzierten Reaktionen

Nachdem unter 3.1 gezeigt wurde, dass sich die *Quenched*- und die *Stopped-Flow*-Methode dazu eignen, die SAP-induzierte Änderungen der cNMP-Konzentration, des pH-Werts und der Ca^{2+} -Konzentration zeitlich zu verfolgen, werden in den folgenden Kapiteln die Ergebnisse der Messungen beschrieben.

Unter 3.2.1 wird die SAP-induzierte Änderung der cNMP-Konzentration zunächst an Spermien von *Arbacia punctulata* und anschließend an Spermien von *Asterias amurensis* gezeigt. Unter 3.2.2 bzw. 3.2.3 werden Messungen des Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstroms bzw. des pH-Anstiegs an *Arbacia punctulata* dargestellt. Unter 3.2.4 wird auf Pharmakologie des Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstroms eingegangen.

3.2.1 Resact-induzierte Änderungen der cNMP-Konzentration in *A. punctulata*-Spermien

Das Modell in Abb. 1.2 geht davon aus, dass Resact an eine Rezeptor-Guanylylzyklase (GC) bindet und damit die Synthese von cGMP stimuliert. Der Anstieg der cGMP-Konzentration wiederum soll über mehrere Zwischenschritte eine Adenylylzyklase (AC) aktivieren und somit einen Anstieg der cAMP-Konzentration hervorrufen. Das Modell sagt voraus, dass nach der Stimulation mit Resact zunächst die cGMP-Konzentration und dann die cAMP-Konzentration ansteigt. Um dies zu überprüfen sollte die Änderung der cGMP- und der cAMP-Konzentration nach der Resact-Stimulation zeitlich aufgelöst gemessen werden.

3.2.1.1 Resact induziert einen schnellen, transienten Anstieg der cGMP-Konzentration

Die mittlere cGMP-Konzentration in unstimulierten Spermien beträgt $1,0 \pm 0,7$ pmol cGMP/ 10^8 Spermien. Welchen Einfluss hat Resact auf die cGMP-Konzentration? Um diese Frage zu beantworten, habe ich Spermien mit Resact-Konzentrationen von 0,25 bis 250 nM stimuliert und die Änderung der cGMP-Konzentration zeitlich verfolgt (Abb. 3.19).

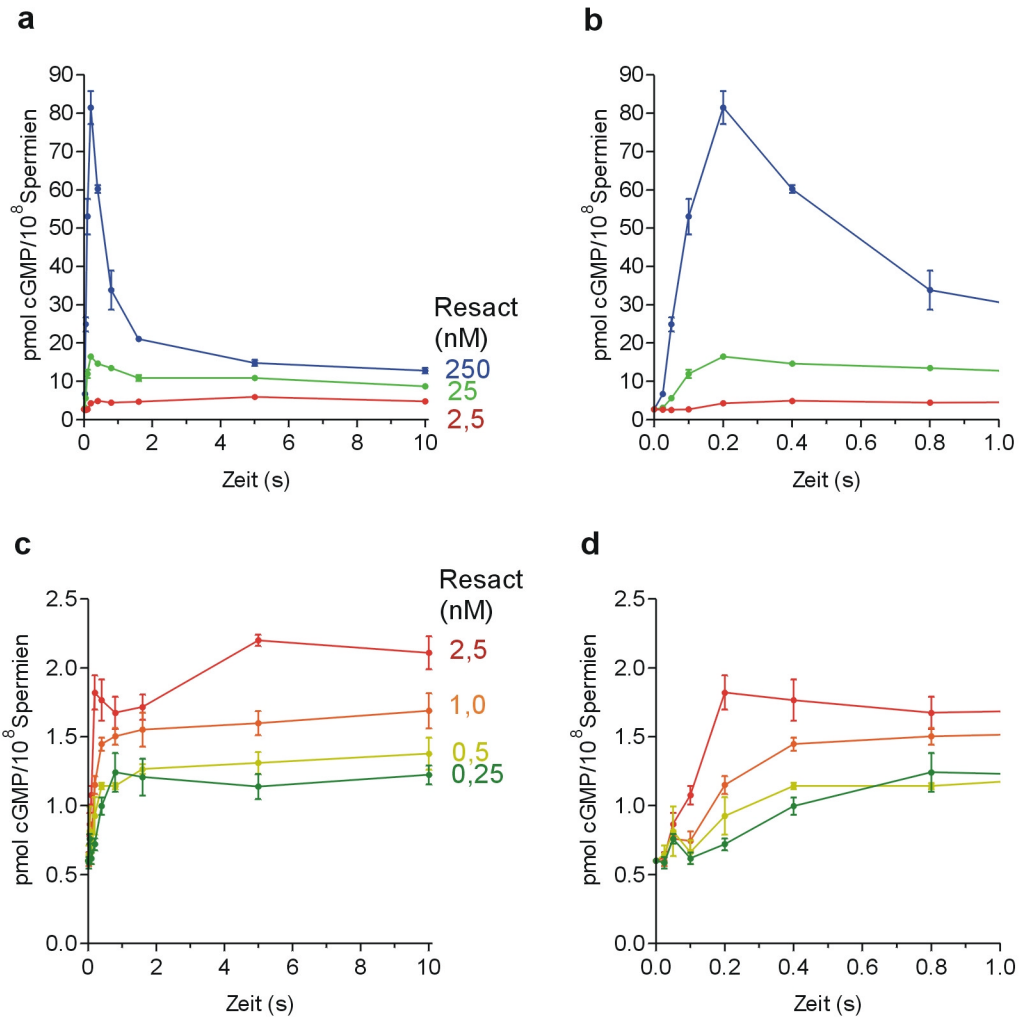


Abb. 3.19: Zeitverlauf der cGMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Resact-Konzentration. (a, c) Die Resact-Konzentrationen sind in den Farben der zugehörigen Kurven angegeben. Die cGMP-Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde in unstimulierten Spermien gemessen. (b, d) Daten aus (a bzw. c) aber auf einer kürzeren Zeitskala gezeigt. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert ($\pm$ Standardabweichung) der Dreifachbestimmung dar. In Kontrollexperimenten (ohne Resact) ist die cGMP-Ruhekonzentration für Stimulationszeiten < 100 ms kleiner als für Stimulationszeiten > 100 ms (Details siehe 3.1.1.2). Die „tatsächliche“ cGMP-Ruhekonzentration wurde bei Stimulationszeiten > 100 ms gemessen. Um die Werte bei Stimulationszeiten < 100 ms zu korrigieren, wurde die Differenz der cGMP-Konzentration zwischen kurzen (< 100 ms) und längeren Stimulationszeiten (> 100 ms) ermittelt. Der Wert der Differenz wurde zu allen Werten bei Stimulationszeiten < 100 ms addiert.

Resact induziert einen schnellen Anstieg der cGMP-Konzentration (Abb. 3.19a, c). Bei 25 und 250 nM Resact erreicht die cGMP-Konzentration ihr Maximum schon nach ~ 200 ms. Die Maximalamplitude, die durch 250 nM Resact hervorgerufen wird, liegt im Mittel bei $30,6 \text{ pmol cGMP}/10^8 \text{ Spermien}$ (Tab. 3.3). Bei Resact-Konzentrationen < 25 nM verläuft der

Anstieg der cGMP-Konzentration langsamer. Beispielsweise wird das Maximum für 0,25 nM Resact erst nach ~ 800 ms erreicht (Abb. 3.19d). Nachdem die cGMP-Konzentration bei 25 nM bzw. 250 nM ihr Maximum erreicht hat, fällt sie deutlich auf ein niedrigeres Niveau ab, dass aber ~ 3 - bzw. ~ 5 -fach höher ist als die cGMP-Ruhekonzentration (Abb. 3.19a). Bei Resact-Konzentrationen < 25 nM bleibt die cGMP-Konzentration nach dem schnellen anfänglichen Anstieg annähernd konstant.

Anhand dieser cGMP-Messungen kann nicht beurteilt werden, ob die cGMP-Antwort bei 250 nM Resact schon gesättigt ist, da keine größeren Resact-Konzentrationen verwendet wurden. Die folgende Rechnung deutet jedoch darauf hin, dass die cGMP-Antwort bei 250 nM Resact schon gesättigt ist:

Bei einer Spermiedichte von $\sim 3 \times 10^8$ Spermien/ml und einer Oberflächenbelegung eines Spermiums mit 14.000 Resact-Rezeptoren (Shimomura & Garbers, 1986) ergibt sich eine Konzentration des Resact-Rezeptors von ~ 5 nM. Für den Speract-Rezeptor wurde eine Affinität für Speract im picomolaren Bereich gemessen (Nishigaki & Darszon, 2000). Wenn der Resact-Rezeptor ebenfalls eine sehr hohe Affinität für Resact besitzt, dann würden bei einer Resact-Konzentration von 250 nM alle Rezeptoren besetzt sein.

3.2.1.2 Der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX verhindert die Abnahme der Resact-induzierten cGMP-Konzentration

Der Resact-induzierte Anstieg der cGMP-Konzentration kann entweder durch Stimulation der GC (cGMP-Synthese) oder durch Inhibition der PDE (cGMP-Hydrolyse) hervorgerufen werden. Denkbar ist auch, dass die Aktivität beider Enzyme durch Resact beeinflusst wird. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, habe ich den Zeitverlauf des Resact-induzierten cGMP-Anstiegs in Anwesenheit des PDE-Inhibitors IBMX gemessen. Ich verwendete 2 mM IBMX, da ich in Messungen an *A. amurensis*-Spermien gezeigt habe, dass 2 mM IBMX die PDE-Aktivität nahezu vollständig inhibieren (Details siehe 3.2.1.5).

Da eine Messung des cGMP-Anstiegs bei verschiedenen Resact-Konzentrationen bis zu 2 h dauert, musste zunächst geklärt werden, ob sich die cGMP-Ruhekonzentration in Anwesenheit von 2 mM IBMX ändert. Dazu wurden unstimulierte Spermien mit 2 mM IBMX inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (bis zu 2 h) wurde die cGMP-Konzentration bestimmt (Abb. 3.20).

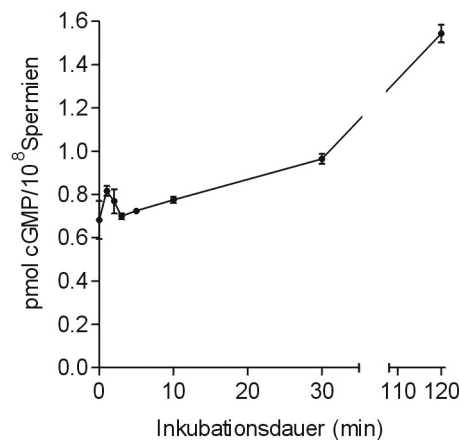


Abb. 3.20: Zeitverlauf der cGMP-Ruhekonzentration nach Mischen der Spermien mit 2 mM IBMX. Der Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ gibt die cGMP-Konzentration in Spermien unmittelbar vor der Zugabe von IBMX an. Jeder Messpunkt stellt die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) der Dreifachbestimmung einer einzelnen Messung dar. Die cGMP-Ruhekonzentration wurde immer bei einer Stimulationszeit von 25 ms gemessen und ist daher niedriger als die „tatsächliche“ cGMP-Ruhekonzentration (Details siehe 3.1.1.2).

Nach der Zugabe von IBMX steigt die cGMP-Ruhekonzentration innerhalb von 120 min langsam von 0,7 auf 1,5 pmol cGMP/10⁸ Spermien an. Dieses Ergebnis wurde durch fünf weitere Experimente bestätigt, bei denen die Anfangs- und Endwerte nach 5 min und 120 min gemessen wurden. Die mittlere cGMP-Ruhekonzentration steigt von $0,6 \pm 0,2$ pmol cGMP/10⁸ Spermien (Bereich: 0,3 – 0,7 pmol cGMP/10⁸ Spermien; $n = 5$) auf $1,2 \pm 0,7$ pmol cGMP/10⁸ Spermien (Bereich: 0,7 – 1,7 pmol cGMP/10⁸ Spermien; $n = 5$). (Die angegebenen cGMP-Ruhekonzentrationen wurden bei einer Stimulationszeit von 25 ms bestimmt und sind daher niedriger als die „tatsächliche“ cGMP-Ruhekonzentration (Details siehe 3.1.1.2)).

Aus dem Ergebnis kann man schließen, dass sowohl die GC als auch die PDE in unstimulierten Spermien wenig aktiv sind. Da der IBMX-induzierte Anstieg der cGMP-Ruhekonzentration klein war, wurde er nicht bei der Auswertung des Resact-induzierten Anstiegs der cGMP-Konzentration berücksichtigt. Ich bezog den Resact-induzierten cGMP-Anstieg immer auf die Ruhekonzentration zu Beginn einer Messung.

Als nächstes wurde untersucht, wie sich die cGMP-Konzentration in Spermien ändert, die in Anwesenheit von IBMX mit Resact stimuliert wurden.

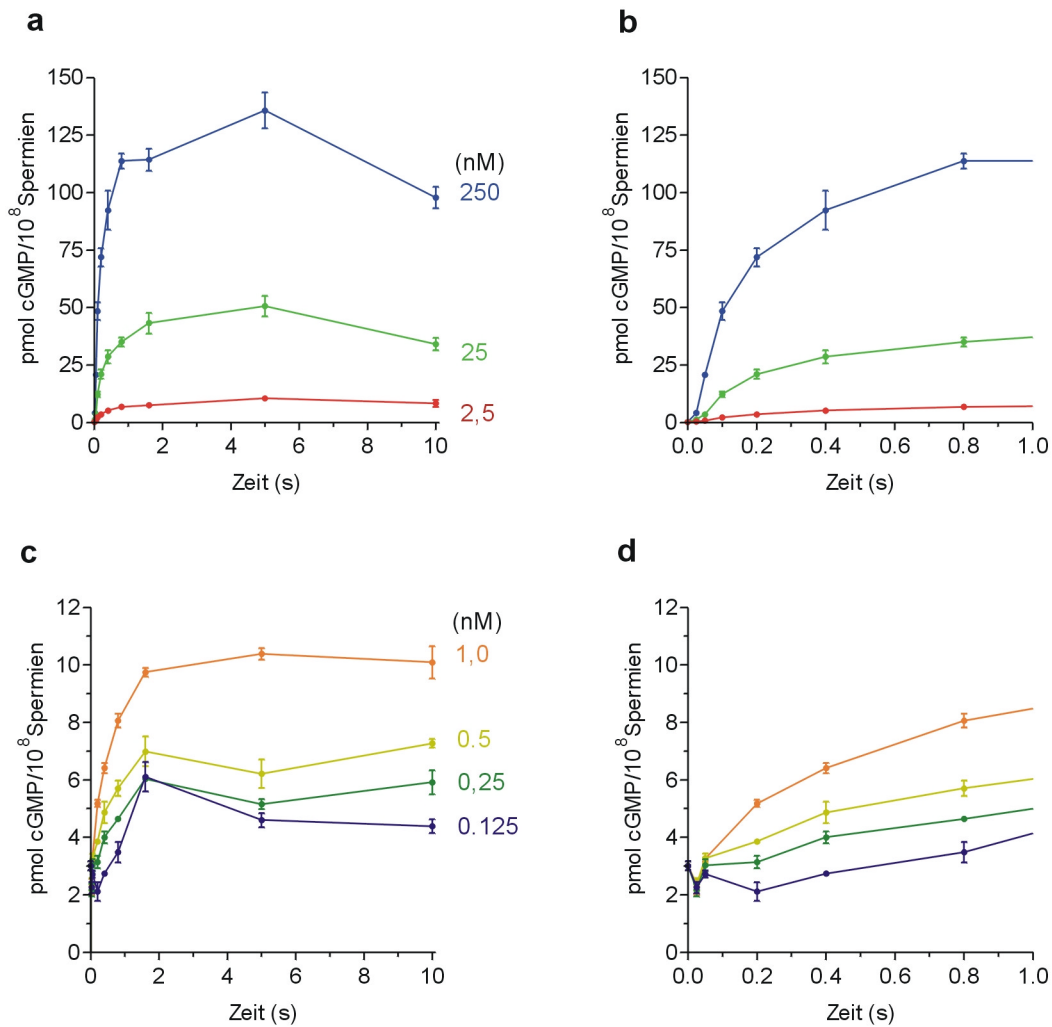


Abb. 3.21: Zeitverlauf der Resact-induzierten Änderung der cGMP-Konzentration in Anwesenheit von IBMX. (a) Die Spermiesuspension wurde ~ 5 min vor Beginn der Messung mit 2 mM IBMX inkubiert. Die Resact-Konzentrationen sind in den Farben der dazugehörigen Kurven angegeben. Der Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ gibt die cGMP-Konzentration in unstimulierten Spermien zu Beginn der Messung an. (b) Daten aus Teil (a) aber auf einer kürzeren Zeitskala gezeigt. Jeder Messpunkt stellt die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) der Dreifachbestimmung einer einzelnen Messung dar. In Kontrollexperimenten (ohne Resact) ist die cGMP-Ruhekonzentration für Stimulationszeiten < 100 ms kleiner als für Stimulationszeiten > 100 ms (Details siehe 3.1.1.2). Die „tatsächliche“ cGMP-Ruhekonzentration wurde bei Stimulationszeiten > 100 ms gemessen. Um die Werte bei Stimulationszeiten < 100 ms zu korrigieren, wurde die Differenz der cGMP-Konzentration zwischen kurzen (< 100 ms) und längeren Stimulationszeiten (> 100 ms) ermittelt. Der Wert der Differenz wurde zu allen Werten bei Stimulationszeiten < 100 ms addiert. Bei (a, b) war eine derartige Korrektur nicht möglich, da die cGMP-Ruhekonzentration nur bei einer Stimulationszeit von 25 ms gemessen wurde.

Abb. 3.21 zeigt den Zeitverlauf des Resact-induzierten Anstiegs der cGMP-Konzentration in Anwesenheit von IBMX. IBMX beeinflusst die Geschwindigkeit, mit der die cGMP-

Konzentration ansteigt, nur geringfügig. Allerdings ist die Zeit bis zum Erreichen des Maximums länger, da mit IBMX bei allen Resact-Konzentrationen deutlich höhere cGMP-Werte erreicht werden als ohne IBMX (vergleiche Tab. 3.3 und 3.4). IBMX verlangsamt oder verhindert die Abnahme der cGMP-Konzentration nach Erreichen des Maximums (Abb. 3.21a, c). Die Beobachtungen zeigen, dass die PDE schon während der Anstiegsphase aktiviert wird und dass die PDE-Aktivität für den transienten Zeitverlauf der cGMP-Antwort verantwortlich ist.

3.2.1.3 Der Resact-induzierte cAMP-Anstieg ist langsamer und kleiner als der cGMP-Anstieg

Resact induziert einen schnellen, transienten Anstieg der cGMP-Konzentration (siehe 3.2.1.1). Wie aber verläuft der Resact-induzierte cAMP-Anstieg? Um diese Frage zu beantworten, habe ich Spermien mit Resact-Konzentrationen von 0,25 bis 250 nM stimuliert und die Änderungen der cAMP-Konzentrationen zeitlich verfolgt (Abb. 3.22).

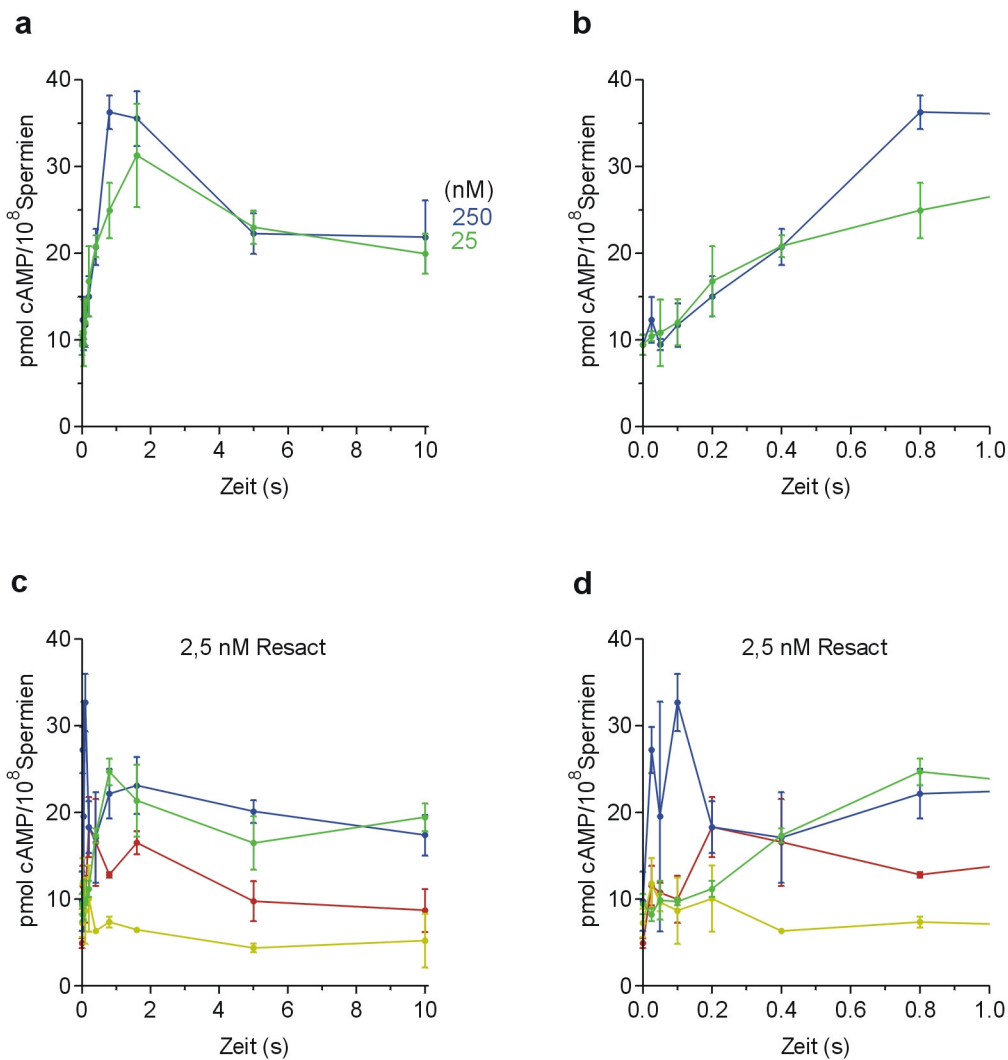


Abb. 3.22: Zeitverlauf der cAMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Resact-Konzentration. (a) Die Resact-Konzentrationen sind in den Farben der dazugehörigen Kurven angegeben. Der Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ gibt die cAMP-Konzentration in unstimulierten Spermien an. (b) Daten aus Teil (a) aber auf kürzerer Zeitskala gezeigt. (c) Zeitverlauf der cAMP-Konzentration von 4 verschiedenen Experimenten, bei denen die Spermien mit 2,5 nM Resact stimuliert wurden. (d) Daten aus Teil (c) aber auf kürzerer Zeitskala. Jeder Messpunkt stellt die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) der Dreifachbestimmung einer einzelnen Messung dar.

Die mittlere cAMP-Ruhekonzentration beträgt $9,0 \pm 8,6$ pmol cAMP/ 10^8 Spermien (Bereich: 1,7 bis 27,6 pmol; $n = 7$). Im Vergleich zum Resact-induzierten cGMP-Anstieg ist der cAMP-Anstieg langsam. Während die cGMP-Konzentration nach 200 ms bereits ihr Maximum erreicht hat (siehe Abb. 3.19b), steigt die cAMP-Konzentration in diesem Zeitraum nur wenig oder überhaupt nicht an (Abb. 3.22a, b). Die cAMP-Konzentration erreicht ihr Maximum frühestens nach 800 ms, in einigen Experimenten sogar erst nach mehr als 1600 ms. Mit

250 nM Resact wird im Mittel ein 3,8-facher Anstieg der cAMP-Konzentration ausgelöst (Tab. 3.3). Nachdem die cAMP-Konzentration ihr Maximum erreicht hat, geht sie auf das ~ 2-fache der Ruhekonzentration zurück (Abb. 3.22a). Bei Resact-Konzentrationen < 25 nM kann ein Anstieg der cAMP-Konzentration nicht reproduzierbar gemessen werden. Um dieses Ergebnis zu verdeutlichen, sind in Abb. 3.22c, d der Zeitverlauf der cAMP-Konzentration (2,5 nM Resact) von vier unterschiedlichen Messungen gezeigt. Nur eine der vier Messungen zeigt einen statistisch signifikanten und stetigen Anstieg der cAMP-Konzentration (grüne Kurve). Bei den anderen Messungen ist ein „Zick-Zack“-förmiger Verlauf (blaue und rote Kurve) oder keine Veränderung der cAMP-Konzentration (gelbe Kurve) zu beobachten. Des Weiteren fällt auf, dass die cAMP-Werte, im Vergleich zu den cGMP-Werten, wesentlich stärker streuen. Insgesamt konnte bei 2,5 nM Resact nur in zwei von neun Messungen (die eine mit und die andere ohne IBMX) ein statistisch signifikanter und stetiger Anstieg der cAMP-Konzentration beobachtet werden.

Da man einen Anstieg der cAMP-Konzentration nur bei Resact-Konzentrationen ≥ 25 nM reproduzierbar messen konnte, wird in Abb. 3.23 der Zeitverlauf des x-fachen Anstiegs der cAMP- und cGMP-Konzentration nur bei 250 nM und 25 nM Resact gezeigt.

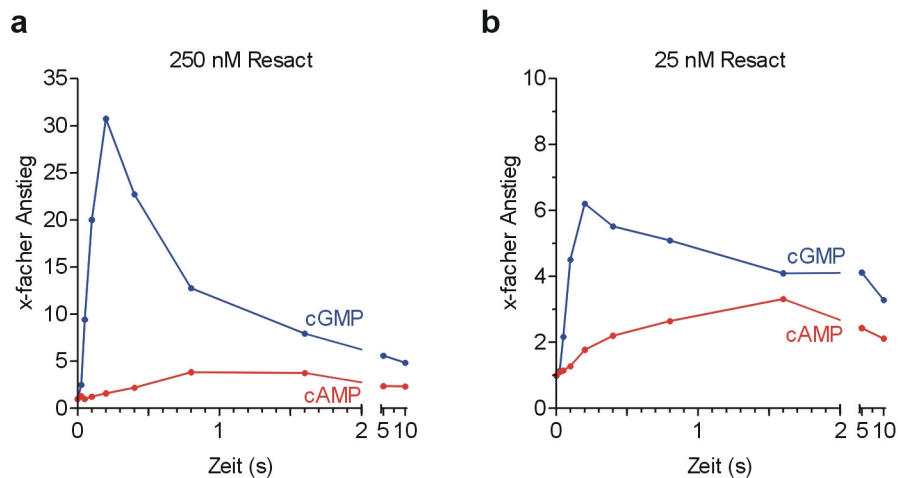


Abb. 3.23: Vergleich der x-fachen Resact-induzierten Änderung der cGMP- und cAMP-Konzentration. Daten aus Abb. 3.2 und 3.6 normalisiert auf die cNMP-Ruhekonzentration. Die Spermien wurden mit 250 nM (a) und 25 nM (b) Resact stimuliert und die cGMP- (blaue Signale) bzw. cAMP-Konzentration (rote Signale) bestimmt. Der x-fache Anstieg bezieht sich auf die Mittelwerte der Messpunkte. Fehlerbalken wurden daher nicht berechnet. Die cGMP- und cAMP-Werte wurden an den selben Spermienproben bestimmt.

Sowohl bei 250 nM als auch bei 25 nM Resact ist der x-fache Anstieg der cAMP-Konzentration wesentlich kleiner und langsamer als der Anstieg der cGMP-Konzentration (Abb. 3.23a, b). Bei 250 nM bzw. 25 nM Resact steigt die cGMP-Konzentration um das 30,8- bzw. 6,2-fache an, die cAMP-Konzentration aber nur um das 3,8- bzw. 3,3-fache.

Tab. 3.3 fasst die Werte der Resact-induzierten cGMP- und cAMP-Konzentrationsänderungen zusammen.

Tab. 3.3: Maximaler Anstieg der cGMP- und cAMP-Konzentration bei verschiedenen Resact-Konzentrationen.

cGMP					
[Resact] nM	pmol/10 ⁸ Spermien ^a		Bereich	x-facher Anstieg ^b	Bereich
0	1,1 ± 0,7	(9)	0,3 – 2,7	-	-
0,25	1,0 ± 0,3	(3)	0,7 – 1,2	2,0 ± 0,1	(3) 1,9 – 2,1
0,5	1,1 ± 0,3	(3)	0,9 – 1,4	2,3 ± 0,3	(3) 2,0 – 2,6
1	1,3 ± 0,4	(4)	1,0 – 1,7	2,5 ± 0,5	(3) 2,0 – 2,8
2,5	3,0 ± 1,9	(7)	1,3 – 5,9	3,3 ± 0,5	(3) 2,7 – 3,6
25	8,7 ± 6,8	(6)	2,2 – 17,9	4,5 ± 1,6	(3) 3,1 – 6,2
250	30,6 ± 21,7	(9)	9,3 – 81,5	19,4 ± 9,9	(3) 12,7 – 30,8

cAMP					
[Resact] nM	pmol/10 ⁸ Spermien ^a		Bereich	x-facher Anstieg ^b	Bereich
0	8,3 ± 7,3	(10)	1,7 – 27,3	-	-
2,5 ^c	27,9 ± 16,8	(3)	12,9 – 46,1	2,2 ± 0,5	(3) 1,7 – 2,5
25	35,8 ± 18,6	(3)	19,9 – 56,2	3,0 ± 0,9	(3) 2,0 – 3,8
250	48,0 ± 30,5	(3)	25,0 – 82,6	3,8 ± 0,9	(3) 3,0 – 4,8

^a Mittelwert ± Standardabweichung (Anzahl der Experimente). ^b Verhältnis der maximalen cGMP- bzw. cAMP-Konzentration zur jeweiligen Ruhekonzentration. Der Mittelwert des x-fachen Anstiegs wurde aus dem x-fachen Anstieg der einzelnen Experimente berechnet. ^c Die maximalen cAMP-Konzentrationen bei Resact-Konzentrationen ≤ 2,5 nM betrachte ich als statistisch nicht signifikant, da die cAMP-Werte scheinbar zufällig liegen (Details siehe Text).

3.2.1.4 IBMX verlangsamt den Resact-induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration

Die cAMP-Konzentration wird ebenfalls von der Aktivität zweier Enzyme bestimmt. Eine Adenylylzyklase (AC) synthetisiert cAMP, während eine PDE cAMP hydrolysiert. Ein Anstieg der cAMP-Konzentration kann entweder durch eine Stimulation der AC oder durch eine Inhibition der PDE verursacht werden. Eine Kombination beider Mechanismen ist ebenso möglich.

Über welchen Mechanismus bewirkt Resact einen Anstieg der cAMP-Konzentration? Um diese Frage zu klären, habe ich den Resact-induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration in Anwesenheit von 2 mM IBMX untersucht (Abb. 3.24). (Es wurde nicht untersucht, ob sich die cAMP-Ruhekonzentration durch IBMX während einer Messung verändert.)

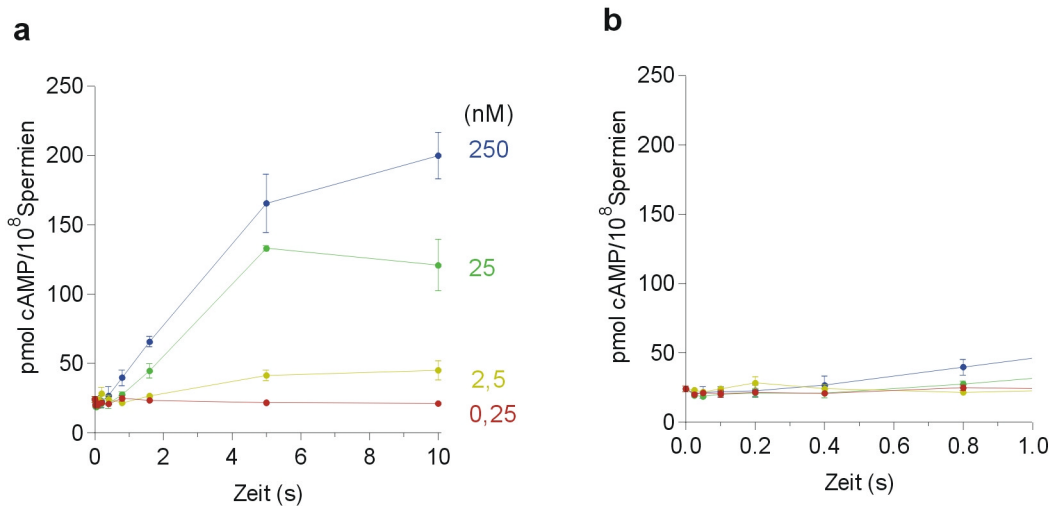


Abb. 3.24: Zeitverlauf des Resact-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration in Anwesenheit von 2 mM IBMX. (a) Die Resact-Konzentrationen sind in den Farben der dazugehörigen Kurven angegeben. Der Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ gibt die cAMP-Konzentration in unstimulierten Spermien zu Beginn der Messung an. (b) Daten aus Teil (a) auf kürzerer Zeitskala gezeigt. Jeder Messpunkt stellt die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) der Dreifachbestimmung einer einzelnen Messung dar.

Die cAMP-Ruhekonzentration liegt bei $23,7 \pm 3,4$ pmol cAMP/10⁸ Spermien (Bereich 20,1 bis 27,0 pmol; $n = 3$). Dieser Wert ist $\sim 4,2$ -fach (Standardabweichung $\pm 1,4$; $n = 3$) höher als ohne

IBMX. Der Anstieg der cAMP-Ruhekonzentration durch IBMX zeigt, dass die cAMP-hydrolysierende PDE schon in unstimulierten Spermien aktiv ist.

Abb. 3.24 zeigt, dass der Anstieg der cAMP-Konzentration nach Stimulation mit 2,5 bis 250 nM – verglichen mit den Messungen ohne IBMX (3.2.1.3) – deutlich langsamer ist. Die cAMP-Konzentration steigt frühestens nach 800 ms an und erreicht innerhalb der Messdauer kein Maximum. Die Geschwindigkeit des Anstiegs nimmt mit der Resact-Konzentration zu. Durch 0,25 nM Resact wird innerhalb der Messdauer kein messbarer Anstieg der cAMP-Konzentration hervorgerufen.

Die Ergebnisse lassen schließen, dass der Resact-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration auf einer Aktivierung der Adenylylzyklase beruht. Die Ursache für den langsameren Anstieg der cAMP-Konzentration, könnte darauf beruhen, dass IBMX die Aktivität der Adenylylzyklase hemmt. Gorczyca und Mitarbeiter (1994) zeigten an Photorezeptoren, dass hohe IBMX-Konzentrationen nicht nur die PDE inhibieren, sondern auch die Aktivität der Guanylylzyklase vermindern. Insgesamt zeigen die Experimente, dass die cAMP-Konzentration erst nach der cGMP-Konzentration ansteigt. Dieses Ergebnis wird später noch ein wichtiges Argument dafür sein, dass der Resact-induzierte Ca^{2+} -Einstrom nicht durch den Anstieg der cAMP-Konzentration ausgelöst wird.

Der x-fache Anstieg der cGMP-Konzentration mit IBMX konnte nicht berechnet werden (Tab. 3.4). Dementsprechend konnte auch nicht der Zeitverlauf des x-fachen Anstiegs der cGMP- und cAMP-Konzentration in Anwesenheit von IBMX miteinander verglichen werden. Der Grund dafür ist, dass die cGMP-Ruhekonzentration in Anwesenheit von IBMX nur bei einer Stimulationszeit von 25 ms bestimmt wurde. Die cGMP-Ruhekonzentration ist daher niedriger als die „tatsächliche“ cGMP-Ruhekonzentration und würde die Werte für den x-fachen Anstieg verfälschen.

Tab. 3.4: Maximaler Anstieg der cGMP- und cAMP-Konzentration bei verschiedenen Resact-Konzentrationen in Anwesenheit von 2 mM IBMX.

cGMP + 2 mM IBMX			
[Resact] nM	pmol/10 ⁸ Spermien ^a		Bereich
0	0,6 ± 0,2	(5)	0,3 – 0,7
0,25	3,6 ± 1,0	(3)	2,9 – 4,8
2,5	9,0 ± 3,1	(3)	5,4 – 11,0
25	32,4 ± 19,3	(4)	9,3 – 50,7
250	90,8 ± 43,3	(4)	39,7 – 135,8

cAMP + 2 mM IBMX

[Resact] nM	pmol/10 ⁸ Spermien ^a		Bereich	x-facher Anstieg ^b		Bereich
0	23,8 ± 3,5	(3)	1,7 – 27,2	-		-
2,5	61,0 ± 23,1	(3)	45,0 – 87,5	2,7 ± 1,4	(3)	1,9 – 4,3
25	158,8 ± 54,2	(3)	122,2 – 221,0	7,0 ± 3,5	(3)	4,5 – 11,0
250	178,0 ± 24,6	(3)	151,4 – 199,9	7,6 ± 1,8	(3)	5,6 – 9,0

^a Mittelwert ± Standardabweichung (Anzahl der Experimente). ^b Verhältnis der maximalen cGMP- bzw. cAMP-Konzentration zu der am Anfang der Messzeit bestimmten cGMP- bzw. cAMP-Ruhekonzentration. Wurde die maximale cAMP-Konzentration nicht innerhalb der Messzeit erreicht, so wurde das Verhältnis des cAMP-Werts nach 10 s zur Ruhekonzentration berechnet. Bei den cAMP-Messungen wurde der Mittelwert des x-fachen Anstiegs aus dem x-fachen Anstieg der einzelnen Experimente berechnet.

3.2.1.5 Asterosap-induzierte Änderung der cNMP-Konzentration in *Asterias amurensis*-Spermien

Ähnlich wie Resact bei *A. punctulata*-Spermien löst Asterosap bei *Asterias amurensis*-Spermien eine Veränderung des Schwimmverhaltens aus (E. Hildebrand, persönliche Mitteilung). Der Asterosap-induzierte Signalweg ist unbekannt. Anhand zeitlich aufgelöster Messungen sollte untersucht werden, ob der Asterosap-Rezeptor – wie der Resact-Rezeptor – eine membranständige GC ist. Trifft diese Vermutung zu, sollte Asterosap einen sofortigen Anstieg der cGMP-Konzentration induzieren.

3.2.1.5.1 Asterosap induziert einen großen, schnellen cGMP-Anstieg

Die mittlere cGMP-Ruhekonzentration beträgt $0,4 \pm 0,2$ pmol cGMP/10⁸ Spermien (siehe Tab. 3.5; Die angegebenen cGMP-Ruhekonzentrationen wurden bei einer Stimulationszeit von 25 ms bestimmt und könnten daher geringer als die „tatsächliche“ cGMP-Ruhekonzentrationen sein (Details siehe 3.1.1.2). Dementsprechend könnten die unten angegebenen Werte des x-fachen Anstiegs der cNMP-Konzentration größer sein, als die Werte des „tatsächlichen“ x-fachen Anstiegs).

Wie verändert sich die cGMP-Konzentration nachdem die Spermien mit Asterosap stimuliert wurden? Asterosap induziert konzentrationsabhängig einen großen und schnellen Anstieg der cGMP-Konzentration (Abb. 3.25a). Bereits eine Asterosap-Konzentration von 1 nM löst noch

einen 6-fachen cGMP-Anstieg aus (Tab. 3.5). Durch 1 μ M Asterosap wird im Mittel ein 126-facher Anstieg der cGMP-Konzentration induziert. Da keine cGMP-Messungen bei Asterosap-Konzentrationen $> 1 \mu$ M durchgeführt wurden, kann nicht beurteilt werden, ob die cGMP-Antwort bei 1 μ M Asterosap schon gesättigt ist. Während bei Asterosap-Konzentrationen ≥ 100 nM der cGMP-Anstieg sein Maximum nach 400 ms erreicht, erreicht er bei Asterosap-Konzentrationen ≤ 10 nM das Maximum erst bei ≥ 5 s. Die halbmaximale cGMP-Konzentration wird bereits nach ~ 250 ms (1 nM Asterosap) bzw. ~ 130 ms (1 μ M Asterosap) erreicht. Bei Asterosap-Konzentrationen ≥ 50 nM fällt die cGMP-Konzentration nach dem Maximum innerhalb von ~ 4 s auf einen niedrigeren Wert ab, um dort während der restlichen Messzeit zu verweilen (Abb. 3.25b). Dieser Wert hängt von der Asterosap-Konzentration ab und beträgt zwischen dem 18-fachen (50 nM Asterosap) und dem 30-fachen (1 μ M Asterosap) der cGMP-Ruhekonzentration.

Mit dem PDE-Inhibitor IBMX sollte untersucht werden, ob der Asterosap-induzierte cGMP-Anstieg auf einer Stimulation der GC, einer Inhibition der PDE oder auf der Aktivität beider Enzyme zurückzuführen ist.

Da eine Messung des cGMP-Anstiegs bei verschiedenen Asterosap-Konzentrationen bis zu 2 h dauert, musste zunächst geklärt werden, ob sich die cGMP-Ruhekonzentration in Anwesenheit von IBMX ändert. Dazu wurden unstimulierte Spermien mit 0,5 bzw. 2 mM IBMX inkubiert und die cGMP-Konzentration wurde nach 5 min bzw. nach 2 h bestimmt. Durch 0,5 mM IBMX steigt die Ruhekonzentration von $0,6 \pm 0,2$ pmol cGMP/ 10^8 Spermien (5 min) um das ~ 2 -fache auf $1,1 \pm 0,7$ pmol cGMP/ 10^8 Spermien (2 h) an ($n = 3$). Die cGMP-Ruhekonzentration konnte in Anwesenheit von 2 mM IBMX nur zweimal gemessen werden. Inkubiert man die Spermien mit 2 mM IBMX, so steigt die cGMP-Ruhekonzentration von 0,06 pmol cGMP/ 10^8 Spermien (5 min) um das 28-fache auf 1,4 pmol cGMP/ 10^8 Spermien (2 h) an.

Da die cGMP-Ruhekonzentration im Laufe eines Experiments sowohl ohne (Details siehe 3.1.1.3) als auch mit 0,5 mM IBMX nur unwesentlich ansteigt, wurde diese Veränderung nicht bei der Auswertung des Asterosap-induzierten cGMP-Anstiegs berücksichtigt. Der x-fache Asterosap-induzierte cGMP-Anstieg wurde immer auf die cGMP-Ruhekonzentration zu Beginn einer Messung bezogen. Die cGMP-Ruhekonzentration verändert sich durch 2 mM IBMX stark. Es wurde daher darauf verzichtet, den Asterosap-induzierten x-fachen cGMP-Anstieg zu berechnen.

Als erstes untersuchte ich den Resact-induzierten cGMP-Anstieg in Anwesenheit von 0,5 mM IBMX. Außer bei 1 μ M Asterosap dauert es durch IBMX länger bis die cGMP-Konzentration ihr Maximum erreicht („time-to-peak“; vergleiche Abb. 3.25c, d und a, b). Im

Vergleich zu Messungen ohne IBMX können mit IBMX nur geringere maximale cGMP-Konzentrationen erreicht werden (Tab. 3.5). Dieser Effekt ist besonders bei der Kurve mit 1 μ M Asterosap ausgeprägt. Des Weiteren nimmt durch IBMX die cGMP-Konzentration nach dem Maximum langsamer ab, als ohne IBMX (Abb. 3.25d). Da die PDE-Aktivität durch 0,5 mM IBMX nicht vollständig blockiert wurde, verwendete ich 2 mM IBMX (Abb. 3.25e, f). Im Vergleich zu 0,5 mM IBMX wurden durch 2 mM IBMX die „time-to-peak“ noch länger, die maximalen cGMP-Konzentrationen wurden geringfügig niedriger und die Abnahme der cGMP-Konzentration wurde noch langsamer (Abb. 3.25e, f). Bei Asterosap-Konzentrationen ≥ 250 nM konnten jedoch selbst 2 mM IBMX die Abnahme der cGMP-Konzentration nicht komplett verhindern.

Folgende Schlussfolgerungen lassen sich anhand der Messungen mit IBMX ziehen:

1. Asterosap stimuliert die Synthese von cGMP.
2. Der transiente Zeitverlauf des cGMP-Signals beruht auf einer Asterosap-induzierten Aktivierung der PDE.
3. Mit zunehmender IBMX-Konzentration werden die maximalen cGMP-Konzentrationen geringer. Dieses Ergebnis könnte darauf beruhen, dass hohe IBMX-Konzentrationen die GC inhibieren. Eine derartige Wirkung von IBMX wurde bei der GC in den Photorezeptoren der Netzhaut beobachtet (Gorczyca *et al.*, 1994).
4. Selbst 2 mM IBMX können die PDE-Aktivität nicht vollständig blockieren.

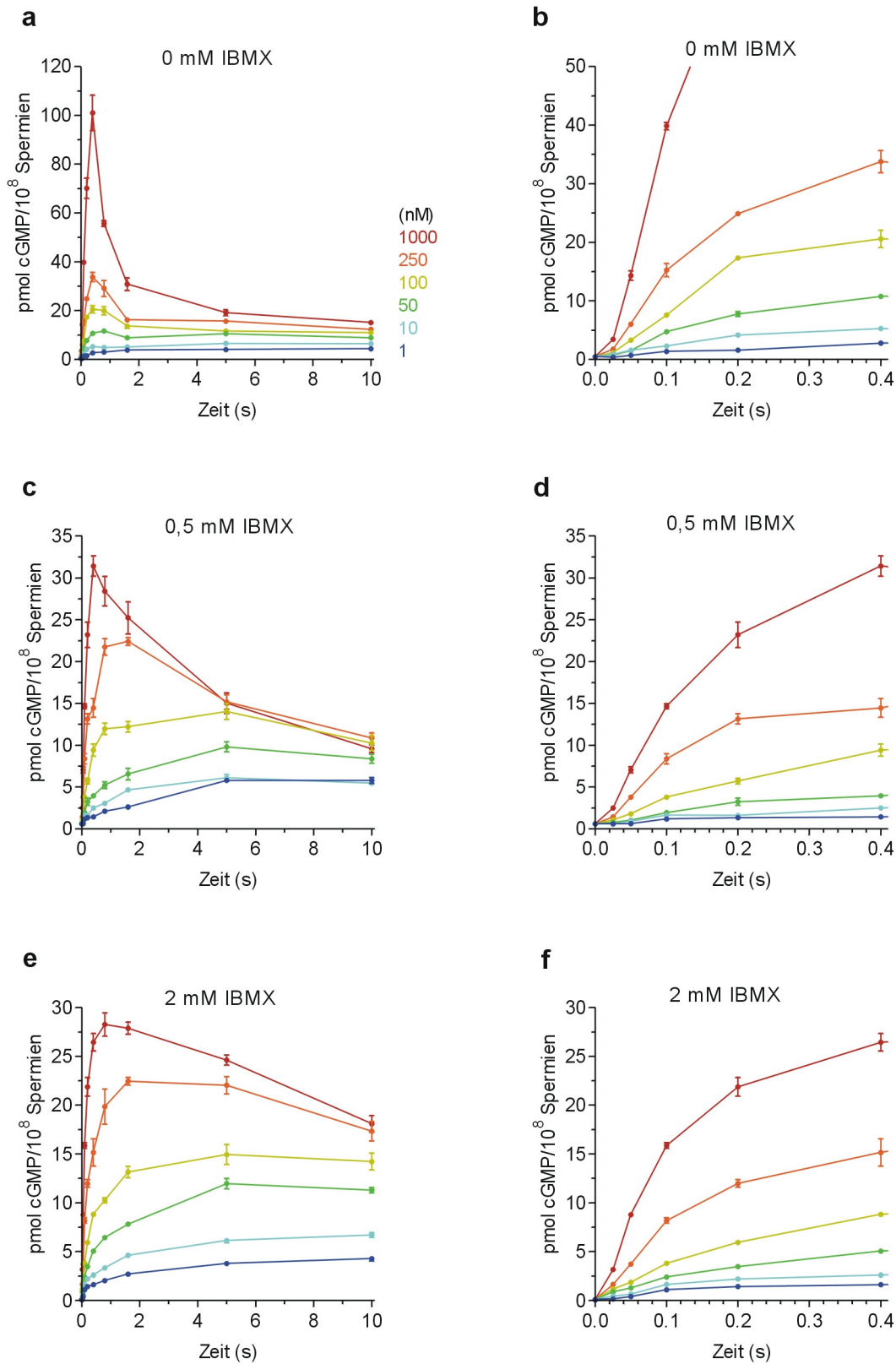


Abb. 3.25: Zeitverlauf der cGMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Asterosap-Konzentration. Die Asterosap-Konzentrationen sind in den Farben der zugehörigen Kurven angegeben. Der Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ gibt die cGMP-Konzentration in unstimulierten Spermien an. **(a)** Asterosap-induzierter cGMP-Anstieg. **(b)** Daten

aus (a), aber auf einer kürzeren Zeitskala gezeigt. (c, d, e, f) Die Spermiesuspension wurde ~ 5 min vor Beginn der Messung mit 0.5 mM IBMX (c, d) bzw. 2 mM IBMX (e, f) inkubiert. (d bzw. f) Daten aus (c bzw. e), aber auf einer kürzeren Zeitskala gezeigt.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob Asterosap auch die cAMP-Konzentration erhöht. Die cAMP-Ruhekonzentration ($5,5 \text{ pmol}/10^8$ Spermien; $n = 2$) ist ungefähr 14-mal höher als die cGMP-Ruhekonzentration. Stimuliert man die Spermien, so induziert selbst $1 \mu\text{M}$ Asterosap keine Änderung der cAMP-Konzentration innerhalb der 10 s langen Messzeit (Abb. 3.26a, b).

Da selbst $1 \mu\text{M}$ Asterosap keinen cAMP-Anstieg auslöst sollte untersucht werden, ob durch Inhibition der PDE mit 2 mM IBMX ein Asterosap-induzierter cAMP-Anstieg messbar ist. Die mittlere cAMP-Ruhekonzentration steigt durch IBMX von $5,5 \text{ pmol cAMP}/10^8$ Spermien auf $33,5 \text{ pmol cAMP}/10^8$ Spermien an ($n = 2$). Ein Asterosap-induzierter Anstieg der cAMP-Konzentration konnte auch in Anwesenheit von IBMX nicht beobachtet werden (Abb. 3.26a).

Die Ruhekonzentration von cGMP und cAMP wird durch IBMX in unterschiedlicher Weise verändert. Während die cGMP-Ruhekonzentration um mehr als das 7-fache abnimmt, steigt die cAMP-Ruhekonzentration um das 6-fache an. Diese unterschiedliche Veränderung lässt folgende Schlussfolgerungen zu: Angenommen, dass IBMX die Hydrolyse von cGMP und cAMP gleich gut inhibiert, so zeigen die Ergebnisse, dass die Aktivität der GC und der AC durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. IBMX könnte einen Ca^{2+} -Einstrom stimulieren, wie es früher bei Spermien der Abalone-Schnecke gezeigt wurde (Kopf *et al.*, 1983; Kopf *et al.*, 1984). Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration könnte die Aktivität der AC über einen Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Mechanismus stimulieren (Kopf & Vacquier, 1984). Ebenfalls könnte – wie oben beschrieben – eine hohe IBMX-Konzentration die GC inhibieren (Gorczyca *et al.*, 1994).

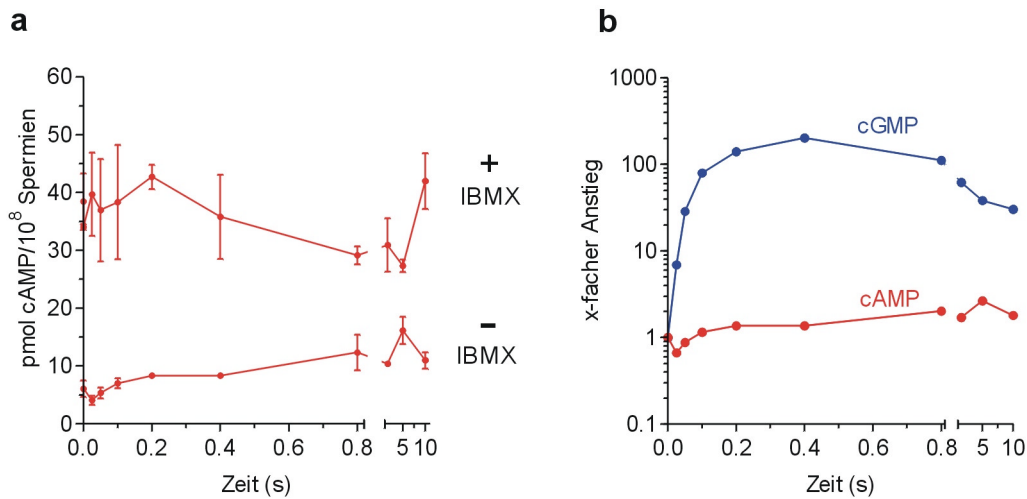


Abb. 3.26: Zeitverlauf der cAMP-Konzentration nach Stimulation mit Asterosap in An- und Abwesenheit von IBMX. Der Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ gibt die cAMP-Konzentration in unstimulierten Spermien an. **(a)** Zeitverlauf der cAMP-Konzentration nach Stimulation mit 1 μ M Asterosap in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) von 2 mM IBMX. **(b)** X-facher Anstieg der cAMP- bzw. cGMP-Konzentration nach Stimulation mit 1 μ M Asterosap. Die cGMP- und cAMP-Konzentrationen wurden an den gleichen Spermienproben bestimmt.

Tab. 3.5: Maximaler Anstieg der cGMP-Konzentration bei verschiedenen Asterosap-Konzentrationen.

^a Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (Anzahl der Experimente). ^b Verhältnis der maximalen cGMP-Konzentration zu der cGMP-Ruhekonzentration. Der Mittelwert des x-fachen Anstiegs wurde aus dem x-fachen Anstieg der einzelnen Experimente berechnet.

cGMP						
[Resact] nM	pmol/10 ⁸ Spermien ^a		Bereich	x-facher Anstieg ^b		Bereich
0	0,4 $\pm$ 0,2	(7)	0,1 – 0,6	-		
1	3,4 $\pm$ 1,3	(3)	2,0 – 4,4	6,4 $\pm$ 2,6	(3)	3,6 – 8,8
10	5,2 $\pm$ 1,3	(5)	4,0 – 6,6	11,0 $\pm$ 2,1	(4)	8,2 – 11,9
50	12,1 $\pm$ 5,9	(3)	6,4 – 18,2	22,6 $\pm$ 11,0	(3)	11,3 – 33,2
100	15,4 $\pm$ 5,7	(3)	9,3 – 20,6	29,0 $\pm$ 12,3	(3)	16,5 – 41,1
250	31,9 $\pm$ 12,6	(3)	18,5 – 43,5	59,8 $\pm$ 24,1	(3)	32,8 – 79,2
1000	40,6 $\pm$ 30,9	(7)	15,6 – 101,0	126,8 $\pm$ 61,6	(5)	56,6 – 201,6

cGMP + 0,5 mM IBMX

[Resact] nM	pmol/10 ⁸ Spermien ^a		Bereich	x-facher Anstieg ^b		Bereich
0	0,6 ± 0,2	(3)	0,4 – 0,8	-		
1	6,0 ± 3,6	(3)	2,6 – 9,7	9,6 ± 3,1	(3)	6,8 – 12,9
10	6,5 ± 3,8	(3)	3,0 – 10,5	10,5 ± 3,1	(3)	7,9 – 14,0
50	10,1 ± 6,3	(3)	4,0 – 16,6	16,1 ± 5,8	(3)	10,5 – 22,1
100	15,8 ± 10,5	(3)	6,3 – 27,1	25,0 ± 10,0	(3)	16,6 – 36,1
250	23,4 ± 13,5	(3)	10,5 – 37,4	37,7 ± 11,3	(3)	27,6 – 49,9
1000	31,1 ± 16,6	(3)	14,4 – 47,5	50,3 ± 12,7	(3)	37,9 – 63,3

cGMP + 2 mM IBMX

[Resact] nM	pmol/10 ⁸ Spermien ^a	Einzelwerte
0	0,06	0,1; 0,02
1	3,4	2,6; 4,3
10	4,9	3,1; 6,7
50	9,3	6,7; 11,9
100	12,3	9,7; 15,0
250	18,1	13,7; 22,4
1000	21,5	14,6; 28,3

3.2.2 Kinetische Messungen der Resact-induzierten Änderung der Ca²⁺-Konzentration

Darszon und Mitarbeiter gehen in ihrem Modell (Abb. 1.2) davon aus, dass der cAMP-Anstieg einen Ca²⁺-Einstrom auslöst. Stimmt diese Beobachtung, so müsste die cAMP-Konzentration vor der Ca²⁺-Konzentration ansteigen. Um dies zu prüfen, sollte als nächstes der Ca²⁺-Einstrom zeitlich aufgelöst gemessen werden.

3.2.2.1 Resact induziert einen „frühen“ und einen „späten“ Ca²⁺-Einstrom

Spermien wurden mit Resact-Konzentrationen von 0,125 pM bis 250 nM Resact stimuliert. Abb. 3.27 zeigt die Ergebnisse einer solchen Messung. Das Ca²⁺-Signal ist abhängig von der Resact-Konzentration. Die Änderungen der Ca²⁺-Konzentration weisen einen komplexen Zeitverlauf auf. Nach einer Latenz-Zeit steigt die Ca²⁺-Konzentration bis zu einem Maximum an und fällt anschließend wieder auf ein Plateau ab, dessen Höhe mit zunehmender Resact-

Konzentration ansteigt (Abb. 3.27a, c). Die Latenz- und die Anstiegszeit verkürzen sich mit zunehmender Resact-Konzentration (Abb. 3.27b, d). Der Rückgang der Signale wird entweder durch eine „Schulter“ (Abb. 3.27a) oder durch ein bis zwei kleinere „Buckel“ charakterisiert (Abb. 3.27e). Bei Resact-Konzentrationen ≥ 125 pM, verwandelt sich die Schulter in ein zweites transientes Ca^{2+} -Signal, welches viel langsamer zu- und abnimmt als das erste Signal (Abb. 3.27d). Diese zwei kinetischen Komponenten des Ca^{2+} -Einstroms bezeichne ich im folgenden als „frühes“ und „spätes“ Ca^{2+} -Signal. Bereits mit 0,125 pM Resact kann man reproduzierbar das frühe Ca^{2+} -Signal induzieren (Abb. 3.27b). Die Signalamplitude des „frühen“ Ca^{2+} -Signals ist maximal, wenn man die Spermien mit 12,5 pM bis 25 pM stimuliert (Abb. 3.27b). Bei Konzentrationen > 25 pM nimmt die Signalamplitude des „frühen“ Ca^{2+} -Signals wieder um $\sim 1/5$ bis $1/2$ der maximalen Signalamplitude ab (Abb. 3.27d). Die Latenz-Zeit wird mit zunehmender Resact-Konzentration immer kürzer und nimmt aber ab 2,5 nM wieder geringfügig zu (Abb. 3.30c). Ebenso wird die Anstiegsphase mit zunehmender Resact-Konzentration kürzer und nimmt erst bei Resact-Konzentrationen > 25 nM wieder zu (Abb. 3.27d). Der Abfall des frühen Ca^{2+} -Signals vor dem Anstieg des späten Ca^{2+} -Signals wird bei höheren Resact-Konzentrationen immer schneller, um erst bei 250 nM Resact wieder langsamer zu werden (Abb. 3.27d). Es scheint so, als ob das frühe Ca^{2+} -Signal bei Resact-Konzentrationen > 25 pM zunehmend unterdrückt wird, um erst ab ~ 250 nM Resact wieder zuzunehmen. Diese Beobachtung deutet auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus hin, der vermutlich durch den schnellen und großen Anstieg der cGMP-Konzentration ausgelöst wird. Die Ursache, weshalb das frühe Ca^{2+} -Signal bei 250 nM Resact wieder größer wird, ist nicht bekannt.

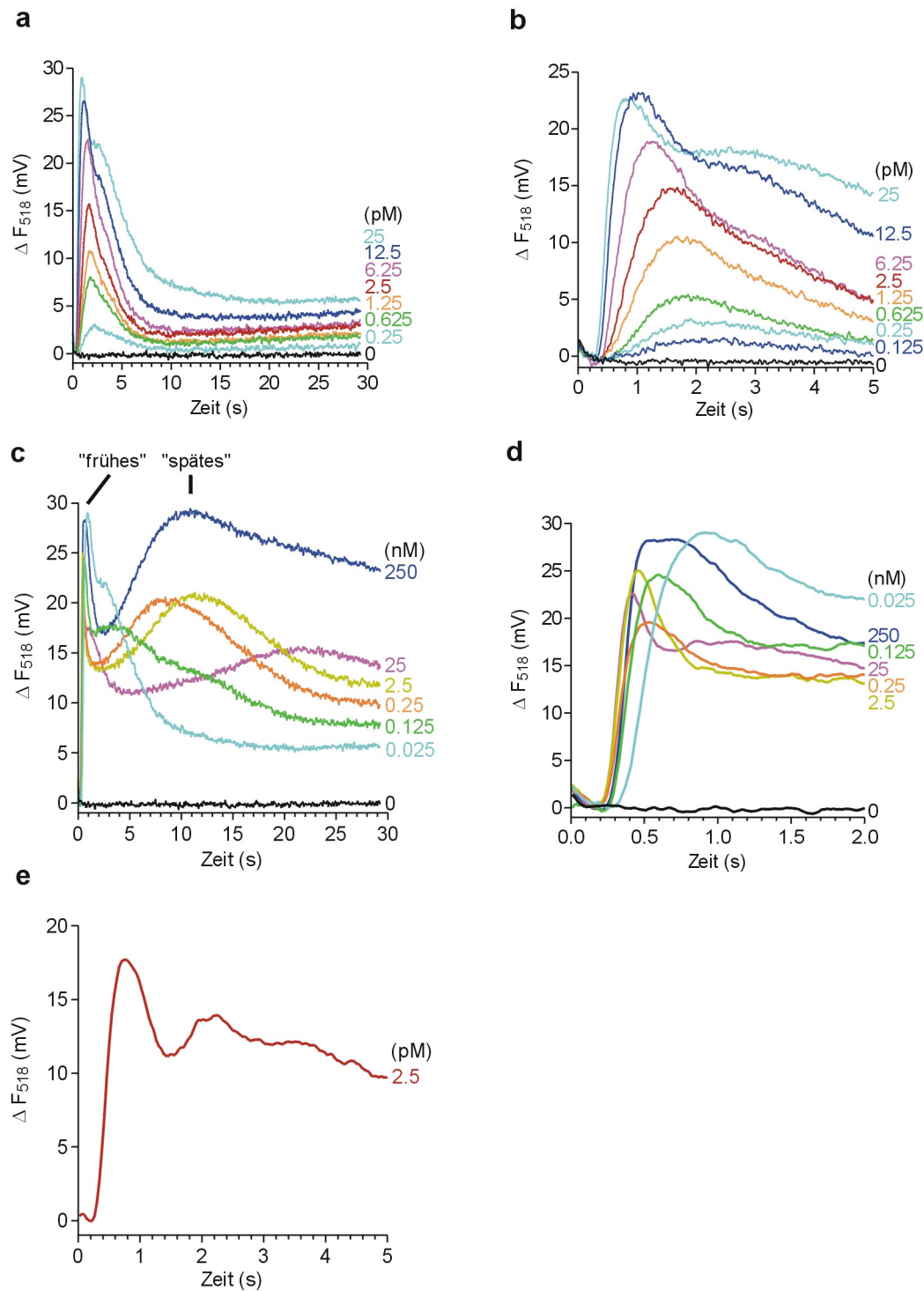


Abb. 3.27: Zeitverlauf des Ca^{2+} -Einstroms nach Stimulation der Spermien mit verschiedenen Resact-Konzentrationen. Die Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit Resact stimuliert. Die Resact-Konzentrationen sind in den Farben der dazugehörigen Kurven angegeben. Alle Kurven zeigen den Ca^{2+} -Einstrom nach Stimulation mit verschiedenen Resact-Konzentrationen: **(a)** 0,25 pM bis 25 pM. **(b)** 0,125 pM bis 25 pM; Andere Spermien-Probe wie (a) und auf einer kürzeren Zeitskala gezeigt. **(c)** 25 pM bis 250 nM; Selbe Spermien-Probe wie (a). **(d)** Daten aus Teil (c) aber auf einer längeren Zeitskala gezeigt. **(e)** 2,5 pM. Andere Spermien-Probe, deren Signale stärker oszillierten.

3.2.2.2 IBMX verhindert den Rückgang des Ca^{2+} -Einstroms

In den Kapiteln 3.2.1.2 und 3.2.1.4 konnte ich zeigen, dass sich die Resact-induzierten cGMP- und cAMP-Signale ändern, wenn man die PDE-Aktivität durch IBMX blockiert. Durch Inkubation mit IBMX wird sowohl die maximale cGMP- und cAMP-Konzentration erhöht, als auch die darauffolgende Abnahme der cGMP- bzw. cAMP-Signale verzögert. Um herauszufinden, ob sich diese Veränderungen auf den Zeitverlauf des Ca^{2+} -Signals auswirken, wollte ich auch den Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in Anwesenheit von IBMX messen. Zuvor wollte ich jedoch prüfen, ob sich die Ca^{2+} -Ruhekonzentration mit IBMX ändert. Daher untersuchte ich zunächst den Zeitverlauf der Ca^{2+} -Ruhekonzentration in An- und Abwesenheit von IBMX (Abb. 3.28).

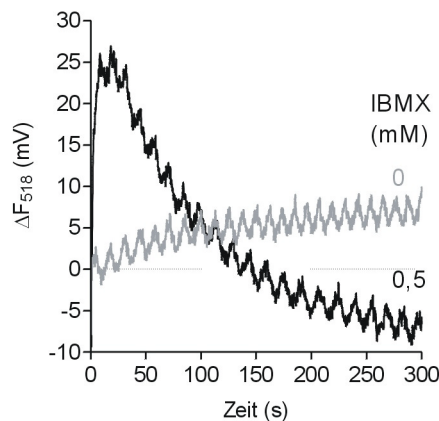


Abb. 3.28: Zeitverlauf der Ca^{2+} -Ruhekonzentration nach Mischen der Spermien mit 0,5 mM IBMX. Fluo-4-beladene Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 0,5 mM IBMX oder ohne IBMX (Kontrolle) gemischt. Die Oszillation der Signale ($\sim 0,1$ Hertz) ist ein Artefakt, dass zur Zeit dieser Messungen nicht beseitigt werden konnte.

Die Ca^{2+} -Ruhekonzentration steigt ohne IBMX nur ganz langsam und geringfügig an (Abb. 3.28, graue Kurve). Im Gegensatz dazu erreicht die Ca^{2+} -Ruhekonzentration mit IBMX (schwarze Kurve) innerhalb von ~ 20 s ein Maximum, das langsam wieder bis unter den Anfangswert abfällt. Messungen über einen Zeitraum von zehn Minuten zeigen, dass die Ca^{2+} -Ruhekonzentration nach ~ 5 min konstant bleibt. Der schnelle Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration lässt darauf schließen, dass IBMX schnell die PDE blockiert, wodurch die cGMP-Konzentration geringfügig ansteigt (siehe 3.2.1.2). Für das Abklingen des Ca^{2+} -Signals ist vermutlich ein negativer Rückkopplungsmechanismus verantwortlich, der beispielsweise den

Ca^{2+} -Ausstrom stimulieren könnte. Aufgrund dieser Ergebnisse entschied ich mich, die Spermien zunächst 5 min mit IBMX zu inkubieren und danach den Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstrom zu messen.

In Abb. 3.29 wird das Resact-induzierte Ca^{2+} -Signal in Anwesenheit von IBMX gezeigt. Die Spermien wurden mit Resact-Konzentrationen von 0,125 pM bis 250 nM stimuliert. Das frühe und das späte Ca^{2+} -Signal werden durch IBMX unterschiedlich verändert. Der Rückgang des frühen Ca^{2+} -Signals wird durch IBMX fast vollständig inhibiert (Abb. 3.29a, b) und die Latenz-Zeit wird durch IBMX nahezu verdoppelt (Abb. 3.29e). Des Weiteren wird durch IBMX das frühe Ca^{2+} -Signal mit zunehmender Resact-Konzentration wesentlich stärker unterdrückt als ohne IBMX. Bei Resact-Konzentrationen $> 2,5$ nM wird das frühe Ca^{2+} -Signal sogar komplett unterdrückt (Abb. 3.29d). Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass cGMP nicht nur an der Auslösung des frühen Ca^{2+} -Signals beteiligt ist, sondern auch bei der negativen Rückkopplung, die das frühe Ca^{2+} -Signal abschwächt.

Das späte Ca^{2+} -Signal verliert durch IBMX seinen transienten Charakter (Abb. 3.29a, c). Nachdem das späte Ca^{2+} -Signal sein Maximum erreicht hat, bleibt es für die restliche Messzeit praktisch konstant. Des Weiteren wird die Signalamplitude des späten Ca^{2+} -Signals durch IBMX viel größer als die Signalamplitude des frühen Ca^{2+} -Signals (Abb. 3.29c). Die großen Signalamplituden des späten Ca^{2+} -Signals ermöglichten es das frühe Ca^{2+} -Signal von dem späten Ca^{2+} -Signal eindeutig zu unterscheiden. Dadurch konnte ich die Empfindlichkeit der beiden Signale für Resact bestimmen, indem ich die Größe der jeweiligen Signalamplituden in Abhängigkeit von der Resact-Konzentration auftrug (Abb. 3.29f). Der $K_{1/2}$ des späten Ca^{2+} -Signals war ~ 500 -fach größer als der $K_{1/2}$ des frühen Signals (jeweils $1000 \text{ pM} \pm 870$ (Bereich: 300 bis 2000 pM; $n = 3$) und $1,8 \text{ pM} \pm 1,3$ (Bereich: 0,8 bis 3,2 pM; $n = 3$)) (Abb. 3.29f). IBMX scheint keine Auswirkung auf den $K_{1/2}$ -Wert des frühen Ca^{2+} -Signals zu haben, da in Abwesenheit von IBMX der $K_{1/2} = 1,6 \text{ pM} \pm 0,6$ (Bereich: 0,8 bis 2,7 pM; $n = 11$) ist. Die verschiedenen Zeitverläufe der frühen und der späten Signale, sowie ihre unterschiedliche Empfindlichkeit auf Resact und IBMX lassen verschiedene Hypothesen für den Mechanismus des Ca^{2+} -Einstroms zu:

Erstens, Ca^{2+} könnte entweder durch einen Leitwert in das Spermium strömen, der durch zwei verschiedene Mechanismen reguliert wird, oder Ca^{2+} könnte über zwei verschiedene Ca^{2+} -Leitwerte in die Zelle strömen, wovon der eine z.B. im Kopf und der andere im Flagellum lokalisiert ist.

Zweitens, Ca^{2+} gelangt über zwei verschiedene Kanäle in das Spermium.

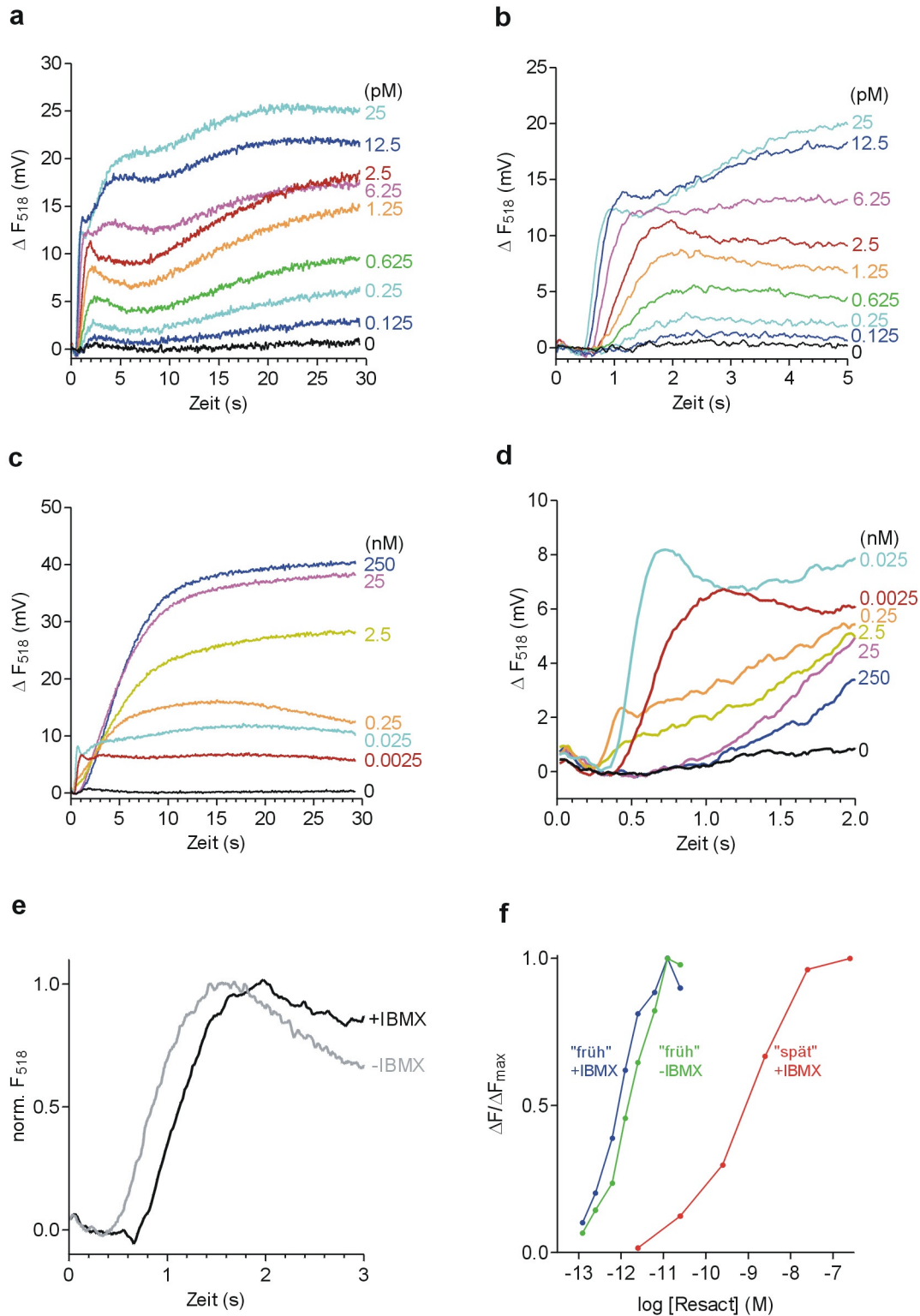


Abb. 3.29: Ca^{2+} -Einstrom nach Stimulation der Spermien mit verschiedenen Resact-Konzentrationen in Anwesenheit von 0,5 mM IBMX. Die Resact-Konzentrationen sind in den Farben der dazugehörigen Kurven angegeben. Die Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ stimuliert. **(a)** Ca^{2+} -Signale nach Stimulation mit 0,125 pM bis 25 pM Resact. **(b)** Daten aus Teil (a) aber auf kürzerer Zeitskala gezeigt. **(c)** Ca^{2+} -Signale nach Stimulation mit 2,5 pM bis 250 nM; Andere Spermien-Probe wie (a, b). **(d)** Daten aus Teil (c) aber auf kürzerer Zeitskala gezeigt.

(e) Normalisierte Ca^{2+} -Signale nach Stimulation mit 2,5 pM Resact in An- und Abwesenheit von IBMX. (f) Normalisierte Dosis-Wirkungskurve des maximalen frühen Ca^{2+} -Einstroms in An- und Abwesenheit von IBMX und des maximalen späten Ca^{2+} -Einstroms in Anwesenheit von IBMX.

3.2.2.3 Spermien reagieren auf einzelne Resact-Moleküle

Die Distanz, über die eine Eizelle ein Spermium anlocken kann, hängt von der Empfindlichkeit ab, mit der das Spermium auf den Lockstoff der Eizelle reagiert. Anhand des Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstroms habe ich die Empfindlichkeit der Spermien auf Resact bestimmt. Die Oberflächenbelegung eines Spermiums mit Resact-Rezeptoren beträgt 14.000 Resact-Rezeptoren pro Spermium (Shimomura & Garbers, 1986). Da bei den Ca^{2+} -Messungen Spermiedichten von $\sim 1,5 - 5 \times 10^8$ Spermien/ml eingesetzt wurden, errechnet sich eine Konzentration der Resact-Rezeptoren von 2,3 – 11,7 nM. Nishigaki und Darszon (2000) konnten für den Speract-Rezeptor zeigen, dass der K_D für Speract im picomolaren Bereich liegt. Hat der Resact-Rezeptor einen ähnlich niedrigen K_D für Resact, so sollten alle Resact-Moleküle von den Resact-Rezeptoren gebunden werden, wenn man die Spermien mit $\leq 0,25$ nM Resact mischt. Um dies zu überprüfen, habe ich Spermien nach der Zugabe von Resact abzentrifugiert und den Überstand mit neuen Fluo-4-beladenen Spermien gemischt. Tatsächlich beobachtet man keinen Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstrom (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass alle Resact-Moleküle an die Spermien gebunden haben und deshalb der Überstand kein Resact enthielt.

Bei 0,5 pM Resact (3×10^8 Moleküle/ml) kommt bei einer mittleren Spermiedichte von 3×10^8 Spermien/ml durchschnittlich ein einziges Resact-Molekül auf ein Spermium. Dementsprechend sollten die Fluoreszenzsignale bei Resact-Konzentrationen < 1 pM Reaktionen auf einzelne Resact-Moleküle darstellen. Wenn es sich bei den Fluoreszenzsignalen tatsächlich um ein Ensemble von Einzel-Molekül-Antworten handelt, dann sollte die Latenz-Zeit unabhängig von der Resact-Konzentration gleich bleiben und der Zeitverlauf der normalisierten Signale sollte identisch sein. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der im Folgenden beschriebenen Experimente bestätigt:

Die Form der normalisierten Ca^{2+} -Signale ist bei Resact-Konzentrationen von 0,125 bis 0,625 pM identisch (Abb. 3.30a). Erst bei höheren Konzentrationen (~ 1 pM) beginnt der Zeitverlauf sich zu ändern (Abb. 3.30b). Auch die Latenz-Zeit bleibt bei sehr niedrigen Resact-Konzentrationen konstant und beginnt sich erst ab ≥ 1 pM Resact zu verkürzen (Abb. 3.30c).

Der frühe Ca^{2+} -Einstrom sättigt zwischen 12,5 und 25 pM Resact, d.h. wenn näherungsweise 50 bis 100 Moleküle gebunden sind bzw. 0,35% bis 0,7% der Resact-Rezeptoren besetzt sind. Aus diesem Grund kann die Sättigung der Rezeptoren mit dem Liganden nicht für die Sättigung des Signals verantwortlich sein.

Die in Abb. 3.30d gezeigte Änderung der normalisierten, maximalen Amplitude ($\Delta F/\Delta F_{\max}$) in Abhängigkeit von der Resact-Konzentration wird gut durch eine exponentielle Sättigungsfunktion beschrieben:

$$\Delta F / \Delta F_{\max} = 1 - e^{-kx} \quad (1)$$

wobei x die mittlere Anzahl der Resact-Moleküle, die pro Spermium gebunden sind, darstellt und k eine Proportionalitätskonstante des Spermiums ist. Eine ähnliche Gleichung beschreibt die Relation zwischen Blitzenergie und der elektrischen Antwort in Stäbchen-Sehzellen (Lamb, *et al.*, 1981). Die Grundlage für Gleichung (1) und die molekulare Interpretation von k wird durch ein einfaches Modell deutlich. Die drei grundlegenden Annahmen für dieses Modell sind:

1. Die Bindung eines Resact-Moleküls öffnet nur Ca^{2+} -permeable Kanäle innerhalb eines kurzen räumlichen Segments des Flagellums, aber nicht außerhalb dieses Segments.
2. Die Bindung eines Resact-Moleküls aktiviert das Segment vollständig. Die Bindung eines zweiten Moleküls (innerhalb eines kurzen Zeitraums) vergrößert nicht das Ca^{2+} -Signal.
3. Die Resact-Moleküle binden entlang des Flagellums gemäß der Poisson-Verteilung. Das bedeutet, dass die Resact-Moleküle unabhängig davon binden können, ob schon ein Resact-Molekül gebunden ist.

Die Anzahl der Segmente eines Flagellums entspricht $1/k$ und $\ell \times k$ ist die Länge eines stimulierten Segments (ℓ = Länge des gesamten Flagellums). Die Wahrscheinlichkeit, mit der $1/k$ Segmente mit einem oder mehreren Molekülen stimuliert werden, wird durch die Poisson-Verteilung beschrieben:

$$P_{(\geq 1)} = 1 - P_{(0)} \text{ oder } 1 - e^{-kx} \quad (2)$$

wobei $P_{(0)}$ die Wahrscheinlichkeit ist, dass eine Zelle kein Resact-Molekül bindet. Dieses Modell beschreibt die gezeigten Dosis-Wirkungskurven gut (Abb. 3.30d). Aus elf Experimenten die ähnlich waren wie das in Abb. 3.30d gezeigte, bestimmte ich einen

Mittelwert von $10,4 \pm 4,2$ Segmenten pro Flagellum ($n = 11$). Die Länge des Flagellums beträgt $\sim 50 \mu\text{m}$; deshalb kann jedes Resact-Molekül ein Segment von $\sim 5 \mu\text{m}$ Länge aktivieren.

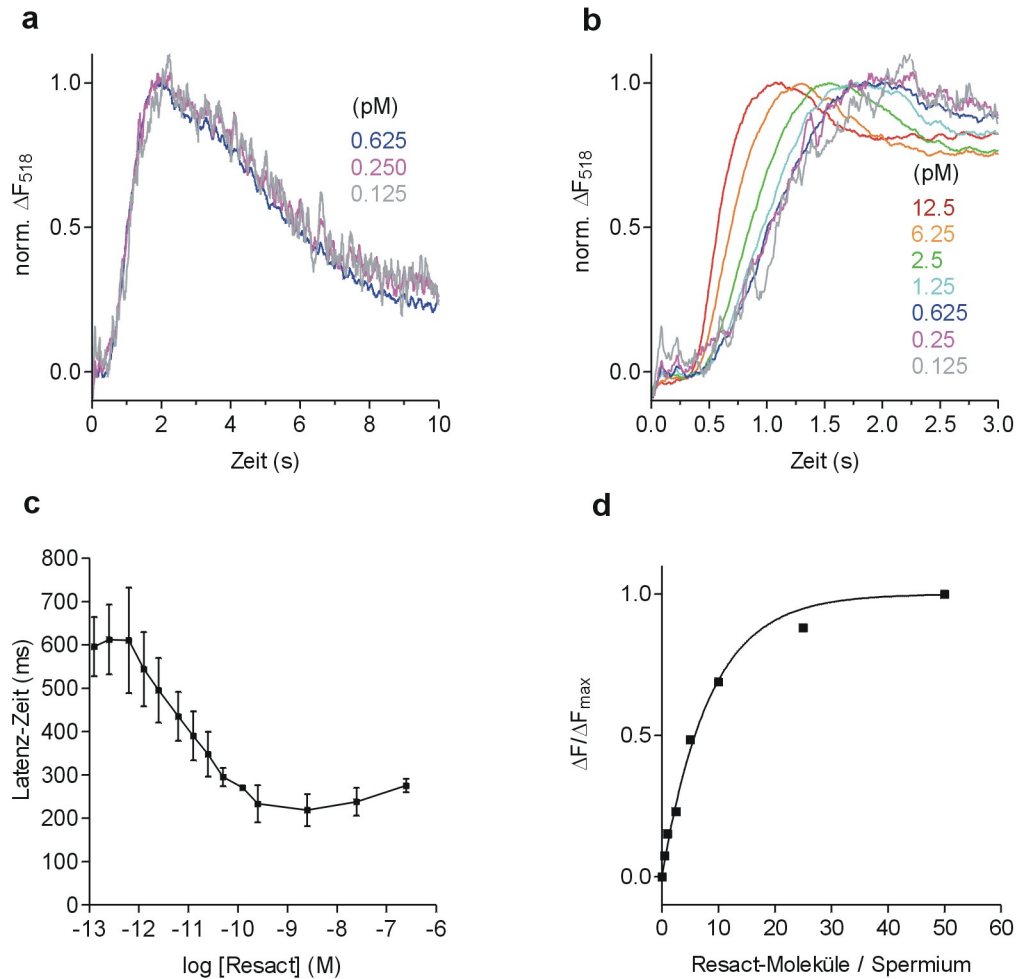


Abb. 3.30: Ca^{2+} -Einstrom von Spermien, die mit einzelnen Resact-Molekülen stimuliert werden. (a) Normalisierte Ca^{2+} -Signale induziert durch Resact-Konzentrationen $\leq 0.625 \text{ pM}$. (b) Daten von (a), aber auf kürzerer Zeitskala gezeigt und mit Resact-Konzentrationen $\leq 12,5 \text{ pM}$. (c) Abhängigkeit der Latenz-Zeit des Ca^{2+} -Einstroms von der Resact-Konzentration. Die Latenz-Zeit wurde am Schnittpunkt von der Regressionsgraden der Steigung des Signals mit der Zeit-Achse bestimmt. (d) Abhängigkeit der Amplitude des normalisierten frühen Ca^{2+} -Signals von der Anzahl der Resact-Moleküle pro Spermium. Die Anzahl unabhängiger Segmente des Flagellums $1/k$, die mittels Regression mit der Poisson-Verteilung berechnet wurde, ist für das hier abgebildete Experiments 8,4 (Details siehe Text).

3.2.2.4 Caged-zyklische Nukleotide

In vielen Studien der cAMP- und cGMP-Signalwege werden membrangängige Derivate von cGMP oder cAMP (cNMP) verwendet, um intrazelluläre Zielproteine zu aktivieren. Die Nachteile dieser Methode bestehen darin, dass die cNMP-Konzentration in der Zelle nur langsam ansteigt und die cNMP-regulierten Zielproteine nicht zu einem definierten Zeitpunkt aktiviert werden. Da zeitlich aufgelöste Messungen mit diesen herkömmlichen cNMP-Derivaten nicht möglich sind, wurden sogenannte *caged*-cNMP-Verbindungen eingesetzt. Diese *caged*-Verbindungen sind chemisch modifizierte cNMP-Moleküle, die biologisch inaktiv sind. Aus den *caged*-Verbindungen kann man mit Hilfe eines UV-Lichtblitzes cNMP schnell (≤ 1 ms) in Zellen photolytisch freisetzen. Somit kann die cNMP-Konzentration zu einem definierten Zeitpunkt stufenförmig erhöht werden. Die Eigenschaften einer *caged*-Verbindung hängen in erster Linie von der Natur der *caging*-Gruppe ab. Bei den *caged*-cNMP-Verbindungen wurden bisher vier verschiedene Klassen von *caging*-Gruppen verwendet (zur Übersicht siehe Kaupp & Seifert, 2002 und Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Eigenschaften der verschiedenen *caged*-cNMP-Verbindungen.

	Löslichkeit (μM)	λ_{max} (nm)	Absorption ($\epsilon[\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$)	ϕ	Halbwertszeit (h)	τ
cGMP						
NPE-cGMP	225	255	17.000	0,25	-	-
DMNB-cGMP	125	347	5.500	0.004	-	300 μs
MCM-cGMP	15	327	13.300	0,21	< 500	einige ns
DEACM-cGMP ^a	120	403	19.300	0,25	> 1.000	einige ns
CMCM-cGMP ^b	> 1.000	325	11.200	0,10	> 1.000	einige ns
BCMCM-cGMP ^b	> 1.000	347	11.200	0,10	> 1.000	einige ns
cAMP						
NPE-cAMP	-	260	19.000	0,39	-	230 ms
Desyl-cAMP	-	320	500	0,34	0,5	einige ns
DMNB-cAMP	> 100	345	5.800	0,05	-	3 ms
MCM-cAMP	25	325	13.300	0,10	> 1.000 ^a	einige ns
DEACM-cAMP ^a	135	402	18.600	0,21	> 1.000	einige ns
CMCM-cAMP ^a	900	326	12.500	0,12	> 1.000	einige ns
BCMCM-cAMP ^b	1.000	347	12.400	0,08	> 1.000	einige ns

ϕ = Quantenausbeute; τ = Dauer der photolytischen Freisetzung; ϵ = Extinktionskoeffizient; ^a axiales Isomer; ^b äquatoriales Isomer; NPE = 1-(2-Nitrophenyl)ethyl; Desyl = Desoxybenzoinyl; DMNB = 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl; MCM = 7-Methoxy-coumarin-4-yl)methyl. Die Tabelle wurde aus Kaupp & Seifert (2002) übernommen.

Um physiologische Reaktionen zeitlich aufgelöst in Zellen messen zu können, müssen die *caged*-cNMP-Verbindungen folgende Eigenschaften aufweisen:

1. Die Löslichkeit von *caged*-cNMP sollte hoch sein. Je höher die Konzentration von *caged*-cNMP in der Zelle ist, um so mehr cNMP kann mit einem Blitz freigesetzt werden.
2. *Caged*-cNMP muss resistent gegen Solvolyse sein (die *caging*-Gruppe ist an das cNMP über eine Estergruppe gekoppelt, die in wässriger Lösung hydrolysiert werden kann). Anderenfalls wird während der Experimente und bei der Lagerung von gelöstem *caged*-cNMP das cNMP freigesetzt.
3. Sowohl die Absorption als auch die Quantenausbeute einer *caged*-Verbindung sollte hoch sein, um eine hohe Photoeffizienz zu erlangen.
4. Die photolytische Spaltung sollte im Vergleich zu der untersuchten physiologischen Reaktion schnell sein (≤ 1 ms).
5. Um eine Schädigung der Zellen mit kurzwelligen UV-Blitzen zu vermeiden, sollte sich das Absorptionsmaximum von *caged*-cNMP möglichst im längerwelligen Bereich des Spektrums befinden.

Keine der bisher bekannten *caged*-cNMP-Verbindungen erfüllt alle der aufgezählten Anforderungen. Dr. V. Hagen (FMP, Berlin) synthetisierte eine neuartige *caged*-cNMP-Verbindung, die diesen Anforderungen gerecht werden sollte (Hagen *et al.*, 2001; Hagen *et al.*, 2002). Unter 3.2.2.4.1 werden die Eigenschaften dieser neuen *caged*-Verbindung beschrieben und ihre Vorteile gegenüber den herkömmlichen *caged*-cNMP-Verbindungen dargestellt. Anschließend werden unter 3.2.2.4.2 die Messungen der Ca^{2+} -Signale nach der photolytischen Freisetzung von cGMP bzw. cAMP beschrieben.

3.2.2.4.1 BECMCM-*caged*-cNMP

Bei BECMCM-*caged*-cNMP wurde das zyklische Nukleotid über seine Phosphodiester-Gruppe mit der neuartigen *caging*-Gruppe [6,7-Bis(Ethoxycarbonylmethoxy)-Coumarin-4-yl]methyl (BECMCM) verestert (Abb. 3.31).

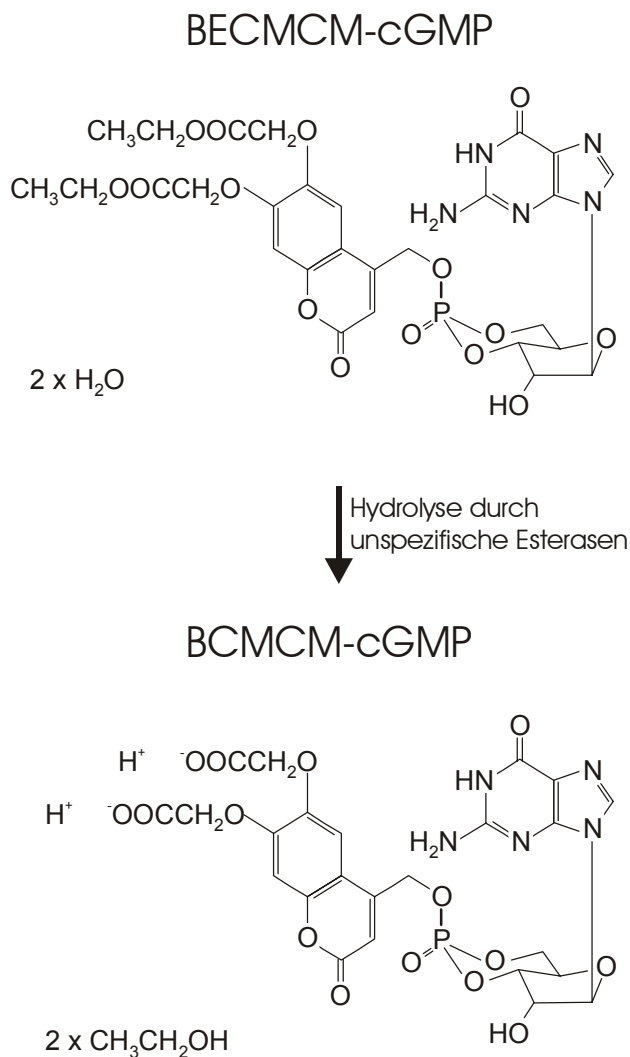


Abb. 3.31: Hydrolyse von BECMCM-caged-cGMP zu BCMCM-caged-cGMP durch unspezifische Esterasen.

Im Vergleich zu anderen *caged*-cNMP-Verbindungen weist BECMCM-*caged*-cNMP folgende Vorteile auf (vergleiche auch Tab. 3.6):

1. BECMCM-*caged*-cNMP ist wegen seiner Hydrophobizität und Neutralität gut membrangängig. Im Zellinneren werden die Ethoxycarbonyl-Ester der *caging*-Gruppe von unspezifischen Esterasen abgespalten, so dass ein bis zwei Carboxyl-Gruppen frei werden. Ohne die beiden Ethoxycarbonyl-Ester liegt die Verbindung als [6,7-Bis(Carboxymethoxy)-Coumarin-4-yl]methyl-cNMP vor (BCMCM-*caged*-cNMP). Da BCMCM-*caged*-cNMP geladen und dadurch schlecht membrangängig ist, reichert es sich in den Zellen an. Darüber hinaus ist BCMCM-*caged*-cNMP

verglichen mit anderen *caged*-cNMP-Verbindungen sehr gut löslich (Details siehe Tab. 3.6). Die Anreicherung und die hohe Löslichkeit von BCMCM-*caged*-cNMP ermöglichen es eine hohe intrazelluläre Konzentration der *caged*-Verbindung zu erreichen. Diese Methode *caged*-cNMP in der Zelle anzureichern, ist vom Prinzip her vergleichbar mit der Anreicherung eines Ca^{2+} -Indikators wie z.B. Fluo-4, wenn man die Zellen mit dem AM-Ester des Indikators inkubiert (3.1.2.1.4).

2. BECMCM-*caged*-cNMP ist praktisch resistent gegen Solvolyse.
3. BCMCM-*caged*-cNMP besitzt eine vergleichsweise gute Photoeffizienz (Details siehe Tab. 3.6). Auf Grund der hohen Photoeffizienz und der hohen intrazellulären Konzentration von BCMCM-*caged*-cNMP kann im Vergleich zu bisherigen *caged*-cNMP-Verbindungen mehr cNMP mit einem Blitz freigesetzt werden.
4. Die Photolyse von BCMCM-*caged*-cNMP dauert nur einige Nanosekunden und ist daher kurz genug, um den Ca^{2+} -Einstrom in Spermien zeitlich aufgelöst zu messen (Details siehe Tab. 3.6).
5. Das Absorptionsmaximum von BCMCM-*caged*-cNMP liegt bei 347 nm und liegt damit im langwelligen UV-Bereich (Details siehe Tab. 3.6).

Auf Grund dieser Vorteile wurde für die folgenden Experimente BECMCM-*caged*-cNMP verwendet.

3.2.2.4.2 Der cGMP-induzierte und der Resact-induzierte Ca^{2+} -Einstrom sind sehr ähnlich

Resact löst einen Anstieg der cGMP- und der cAMP-Konzentration aus. Die beiden cNMP-Signale unterscheiden sich sowohl in ihrem Zeitverlauf als auch in ihrer Resact-Empfindlichkeit. Es stellt sich die Frage, welcher der beiden Botenstoffe den Ca^{2+} -Einstrom auslöst. Das Modell von Cook & Babcock (1993b) schlägt vor, dass der Anstieg der cGMP-Konzentration dazu dient, über weitere Zwischenschritte einen Anstieg der cAMP-Konzentration auszulösen. cAMP soll dann direkt oder über eine pH-Änderung einen Ca^{2+} -Kanal öffnen, wodurch Ca^{2+} in die Zelle strömt. Stimmt dieses Modell, so müsste die Photolyse von *caged*-cAMP schneller einen Ca^{2+} -Einstrom auslösen als die Photolyse von *caged*-cGMP: cAMP kann direkt oder über eine pH-Änderung die Ca^{2+} -Kanäle öffnen, während cGMP noch weitere Zwischenschritte aktivieren muss, um einen Anstieg der cAMP-Konzentration auszulösen. Ist cGMP jedoch ebenfalls in der Lage die Ca^{2+} -Kanäle direkt zu öffnen, so sollte

der cGMP-induzierte Ca^{2+} -Einstrom genauso schnell wie der cAMP-induzierte Ca^{2+} -Einstrom sein.

Um den cNMP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom zu messen, wurden die Spermien mit *caged*-cNMP und Fluo-4 beladen. In der Messküvette der *Stopped-Flow*-Apparatur wurden die Spermien mit einem ~ 1 ms langen UV-Lichtblitz unterschiedlicher Intensität belichtet, wodurch Ca^{2+} -Signale ausgelöst wurden. Im folgenden werde ich zuerst das cGMP-induzierte Ca^{2+} -Signal beschreiben, um es anschließend mit dem cAMP-induzierten Ca^{2+} -Signal zu vergleichen.

Die Form des cGMP-induzierten Ca^{2+} -Signals entspricht einem Ca^{2+} -Signal, das durch niedrige Resact-Konzentrationen ausgelöst wird (Abb. 3.32a, g). Das cGMP-induzierte Ca^{2+} -Signal zeigt sogar die für den Rückgang des Resact-Signals charakteristischen „Buckel“. Das Ca^{2+} -Signal, das durch einen Blitz mit 16 % Lichtenergie ausgelöst wird, ist nahezu identisch mit einem Ca^{2+} -Signal, das durch 6,25 pM Resact induziert wird, wenn man die Latenz-Zeiten von dem jeweiligen Ca^{2+} -Signal subtrahiert (Abb. 3.32g). Sowohl die Latenz-Zeit als auch die Amplitude hängen von der Energie des Lichtblitzes ab (Abb. 3.32a, b, e, f). Die Latenz-Zeit verkürzt sich von 550 ms (Bereich: 500 ms, 600 ms; $n = 2$) bei 1,6 % Lichtenergie auf $154 \text{ ms} \pm 14$ (Bereich: 135 bis 170 ms; $n = 4$) bei 100 %. Die Amplitude der Ca^{2+} -Signale wird mit zunehmender Lichtenergie größer. Diese Dosis-Wirkungsbeziehung kann mit der Hill-Gleichung beschrieben werden (Abb. 3.32f). Der Mittelwert des Hill-Koeffizienten ist $n_H = 2,3 \pm 0,15$ ($n = 7$). Daraus ergibt sich, dass mindestens drei cGMP-Moleküle an der Aktivierung des Kanals beteiligt sind.

Das cAMP-induzierte Ca^{2+} -Signal unterscheidet sich in mehreren Punkten von dem cGMP-induzierten Ca^{2+} -Signal: Erstens, die Zeit die vergeht, bis das Signal sein Maximum erreicht hat („time-to-peak“), ist länger (vergleiche Abb. 3.32a und c). Zweitens, das cAMP-induzierte Ca^{2+} -Signal fällt nach dem Maximum nur kurz ab und bleibt anschließend auf einem Plateau. Drittens, die Latenz-Zeit des cAMP-induzierten Ca^{2+} -Signals nimmt von $155 \text{ ms} \pm 24$ (Bereich: 120 bis 170 ms; $n = 4$) bei 100% Lichtenergie nur auf $358 \text{ ms} \pm 78$ (Bereich: 280 bis 430 ms; $n = 4$) bei 1% zu (Abb. 3.32e). Viertens, die Dosis-Wirkungsbeziehung ist nicht so steil wie die von cGMP und variiert beträchtlich (Abb. 3.32f). In 5 Experimenten waren die cAMP-induzierten Signale bei niedrigen Lichtenergien größer als die cGMP-induzierten Signale. In 3 Experimenten waren die cAMP-induzierten Signale bei allen Lichtenergien kleiner als die cGMP-induzierten Signale (Abb. 3.32f). In 3 Experimenten waren die Werte der Dosis-Wirkungsbeziehung bei niedrigen Lichtenergien für cAMP und cGMP ähnlich (Daten nicht gezeigt). Die Gründe für diese Variabilität sind nicht bekannt.

Zusammenfassend lassen die Messungen des cGMP- und cAMP-induzierten Ca^{2+} -Einstroms folgende Schlussfolgerungen zu:

1. Der Zeitverlauf und die Form der cAMP- und cGMP-induzierten Ca^{2+} -Signale unterscheiden sich von einander. Hierbei fällt besonders das Plateau des cAMP-induzierten Ca^{2+} -Einstroms auf. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass cGMP und cAMP entweder die gleichen Ca^{2+} -Kanäle, aber über unterschiedliche Mechanismen aktivieren, oder dass cGMP und cAMP unterschiedliche Ca^{2+} -Kanäle aktivieren.
2. Die folgende Beobachtungen lassen vermuten, dass der frühe Ca^{2+} -Einstrom durch cGMP ausgelöst wird: Erstens, die cGMP-induzierten Ca^{2+} -Signale haben eine größere Ähnlichkeit mit dem Resact-induzierten Ca^{2+} -Signal als die cAMP-induzierten Signale (vergleiche Abb. 3.27a und 3.32c). Zweitens, die Latenz-Zeit der cGMP- und cAMP-induzierten Ca^{2+} -Signale sind identisch - abgesehen bei niedrigen Lichtintensitäten. Müsste cGMP zuerst einen cAMP-Anstieg auslösen um einen Ca^{2+} -Einstrom zu aktivieren, dann wäre zu erwarten, dass die Latenz-Zeit des cGMP-induzierten Ca^{2+} -Einstroms länger als die des cAMP-induzierten Ca^{2+} -Einstroms ist. Die Latenz-Zeit des Ca^{2+} -Einstroms könnte auf den folgenden Ursachen beruhen: Erstens, cAMP bzw. cGMP müssen weitere Zwischenschritte aktivieren, um einen Ca^{2+} -Einstrom auszulösen. Zweitens, cAMP bzw. cGMP binden an einen Ca^{2+} -Kanal, bei dem einige Zeit zwischen der Bindung und der Aktivierung vergeht.

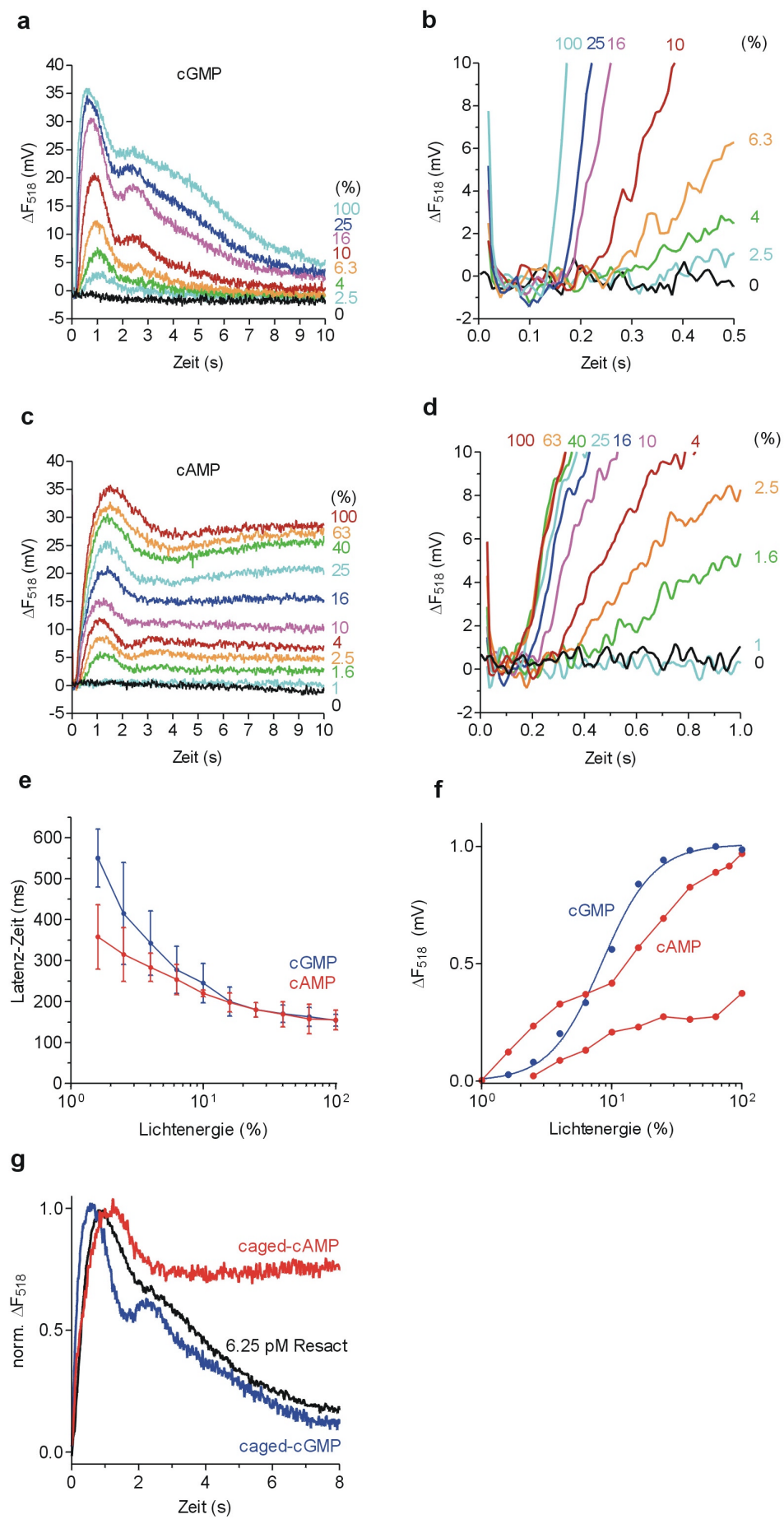


Abb. 3.32: Ca^{2+} -Einstrom in Spermien nach Freisetzung von cGMP oder cAMP. (a) Ca^{2+} -Einstrom induziert durch UV-Blitze in *caged*-cGMP-beladenen Spermien. Die relativen Lichtenergien der UV-Blitze reichten von 1% bis 100% und sind in den Farben der dazugehörigen Kurven angegeben. Die UV-Blitze wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ ausgelöst. (b) Daten aus (a), aber auf einer kürzeren Zeitskala gezeigt. (c) *caged*-cAMP-beladene Spermien. (d) Daten aus (c), aber auf einer kürzeren Zeitskala. (e) Latenz-Zeit des cAMP- und cGMP-induzierten Ca^{2+} -Einstroms in Abhängigkeit von der relativen Lichtenergie. (f) Abhängigkeit der Amplituden des cAMP- und cGMP-induzierten Ca^{2+} -Einstroms von der relativen Lichtenergie (Daten aus (a) und (c)). Die Linie der cGMP-Daten wurde mit der Hill-Gleichung berechnet. Der Hill-Koeffizient war 2,2. (g) Normalisierte Ca^{2+} -Einströme, die durch einen 100% Blitz in *caged*-cGMP- bzw. *caged*-cAMP-beladenen Spermien oder durch 6,25 pM Resact induziert wurden. Von den Ca^{2+} -Signalen wurde jeweils die Latenz-Zeit subtrahiert, so dass der Ca^{2+} -Einstrom bei $t = 0$ beginnt.

3.2.2.5 Caged-Resact

In unserer Arbeitsgruppe untersuchen wir mit Hilfe der Video-Mikroskopie, wie Spermien ihr Schwimmverhalten nach Resact-Stimulation verändern. Der Zeitverlauf der Verhaltensänderung sollte mit dem Zeitverlauf der intrazellulären Reaktionen (cNMP, Ca^{2+} , pH) verglichen werden. Dazu war es notwendig, die Spermien unter dem Mikroskop zu einem definierten Zeitpunkt mit Resact zu stimulieren. Um dieses Problem zu lösen, synthetisierte Dr. V. Hagen (FMP, Berlin) *caged*-Resact. In diesem Abschnitt werden die Eigenschaften von *caged*-Resact beschrieben.

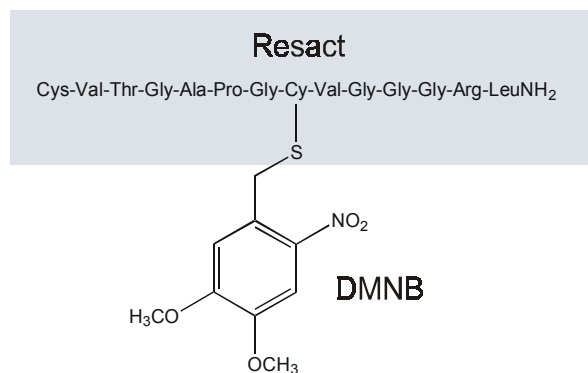


Abb. 3.33: Strukturformel von DMNB-*caged*-Resact. (DMNB: 4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl). Die Synthese wird im Rahmen einer anderen Arbeit beschrieben.

Modifikationen an dem Cystein in Position 8 verringert die Wirksamkeit von Resact einen cNMP-Anstieg zu induzieren (Shimomura & Garbers, 1986a; Daten nicht gezeigt). Daraus kann man schließen, dass Cys8 wichtig ist für die Erkennung von Resact durch seinen Rezeptor. An dieses Cystein wurde über einen Thioester die *caging*-Gruppe 4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl (DMNB) kovalent gekoppelt (Abb. 3.33). Die Quantenausbeute von *caged*-Resact liegt bei 0,035 (mündliche Mitteilung, V. Hagen). Das Absorptionsmaximum und der Absorptionskoeffizient wurden bisher nicht bestimmt, sie sollten jedoch vergleichbar mit anderen *caged*-DNMB-Verbindungen sein (siehe Tab. 3.6). Ich überprüfte, ob *caged*-Resact tatsächlich eine geringere Affinität für den Resact-Rezeptor besitzt und ob mit Hilfe eines UV-Lichtblitzes schnell Resact freigesetzt werden kann. Dazu verglich ich den Ca^{2+} -Einstrom von Spermien, die mit *caged*-Resact gemischt wurden mit dem Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstrom (Abb. 3.34a).

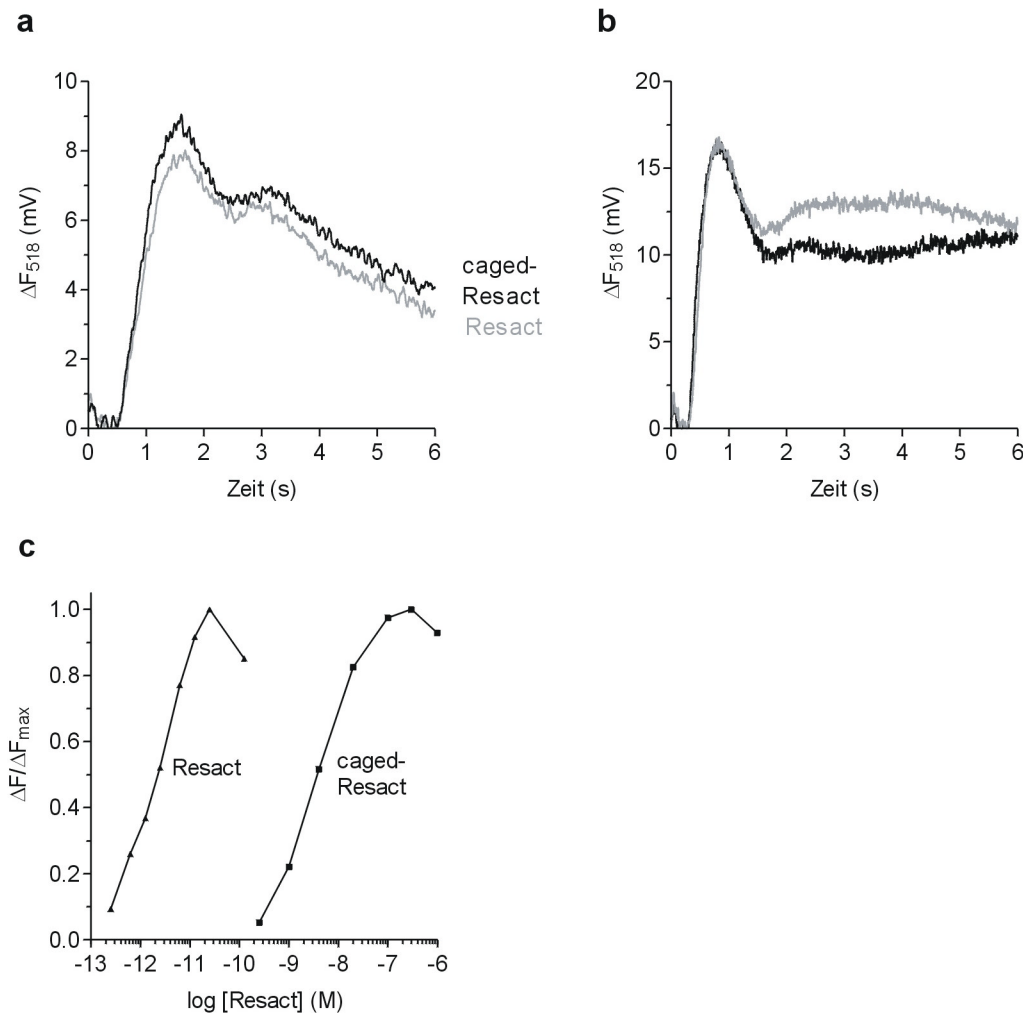


Abb. 3.34: Vergleich des Ca^{2+} -Einstroms nach Mischen der Spermien mit Resact- bzw. *caged*-Resact. (a) Ca^{2+} -Signale induziert durch 1,25 pM Resact (grau) bzw. 4 nM *caged*-Resact (schwarz). (b) Ca^{2+} -Signale induziert

durch 25 pM Resact (grau) bzw. 100 nM *caged*-Resact (schwarz). (c) Beispiel einer Dosis-Wirkungs-Kurve der normalisierten maximalen Amplitude des frühen Ca^{2+} -Einstroms, ausgelöst durch Resact bzw. *caged*-Resact; der $K_{1/2}$ -Wert beträgt 2,0 pM (Resact) bzw. 3,5 nM (*caged*-Resact).

Mit 4 nM bzw. 100 nM *caged*-Resact werden Ca^{2+} -Signale ausgelöst, die in Form und Größe Ca^{2+} -Signalen ähneln, die durch 1,25 pM bzw. 25 pM Resact ausgelöst wurden (Abb. 3.34a, b). Daraus lässt sich schließen, dass die *caging*-Gruppe die Wirksamkeit von Resact um das ~ 3000 -fache verringert. Auffällig ist, dass *caged*-Resact-Konzentrationen > 100 nM (entspricht 30 pM normalem Resact) keinen späten Ca^{2+} -Einstrom induzieren (Abb. 3.34b). Die Ursache dafür ist nicht bekannt.

In Abb. 3.34c werden die Dosis-Wirkungs-Kurven des frühen Ca^{2+} -Einstroms von Resact und *caged*-Resact miteinander verglichen. Man erkennt, dass der $K_{1/2}$ -Wert von *caged*-Resact mehr als drei Größenordnungen zu höheren Konzentrationen hin verschoben ist (*caged*-Resact $K_{1/2} = 4,9 \text{ nM} \pm 1,0$ (Bereich: 3,5 bis 6,0 nM; $n = 5$), Resact $K_{1/2} = 1,6 \text{ pM} \pm 0,6$ (Details siehe 3.2.2.2)). Damit wird das Ergebnis von Abb. 3.34a bestätigt, dass *caged*-Resact ~ 3000 -mal weniger wirksam ist als unmodifiziertes Resact.

Als nächstes untersuchte ich das Ca^{2+} -Signal, das mit *caged*-Resact ($0,5 \mu\text{M}$) ausgelöst wird und das Ca^{2+} -Signal, dass durch einen Lichtblitz ausgelöst wird (Abb. 3.35).

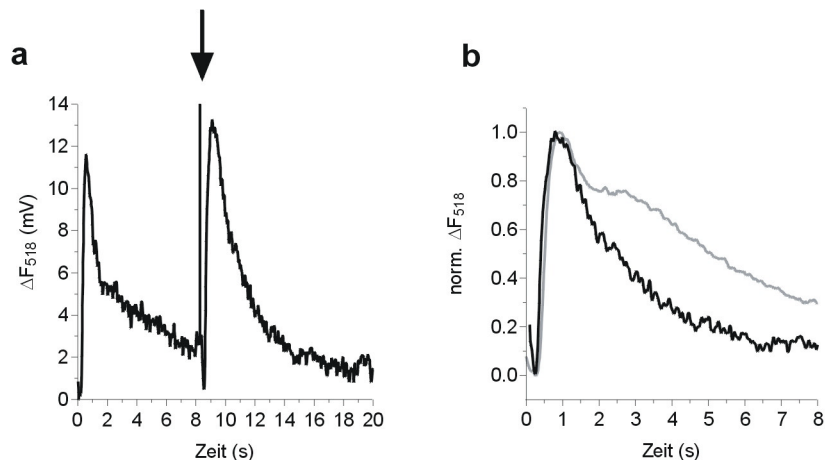


Abb. 3.35: Ca^{2+} -Signal nach Mischen mit *caged*-Resact und nach anschließender Freisetzung von Resact durch einen UV-Blitz. (a) Die Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit $0,5 \mu\text{M}$ *caged*-Resact gemischt. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt des UV-Blitzes an. (b) Normalisiertes Ca^{2+} -Signal nach Stimulation mit 25 pM Resact

(grau) oder nach photolytischer Spaltung von *caged*-Resact (schwarz; Signal aus (a)). Die Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit Resact gemischt bzw. geblitzt.

Nachdem das *caged*-Resact-induzierte Ca^{2+} -Signal sein Maximum erreicht hat, geht die Ca^{2+} -Konzentration wieder nahezu auf den Anfangswert zurück (Abb. 3.35a). Setzt man mit einem UV-Blitz Resact frei, wird ein zweites Ca^{2+} -Signal ausgelöst. In Abb. 3.35b wird die Anstiegsgeschwindigkeit der Ca^{2+} -Signale verglichen, die durch Resact und durch die Photolyse von *caged*-Resact induziert wurden. Durch die Photolyse von *caged*-Resact wird ein Ca^{2+} -Signal induziert, das einem durch 25 pM Resact-induzierten Signal am ähnlichsten ist. Daraus kann man schließen, dass durch einen UV-Blitz ~ 25 pM Resact aus $0,5 \mu\text{M}$ *caged*-Resact freigesetzt wurden. Auffällig ist, dass der Blitz-induzierte Ca^{2+} -Einstrom schneller als der Resact-induzierte Ca^{2+} -Einstrom wieder auf die Ca^{2+} -Ruhekonzentration zurückgeht. Dieses Ergebnis könnte auf einen Adaptationsprozess durch den vorhergegangenen Ca^{2+} -Einstrom zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse zeigen, dass erstmalig ein Eizelllockstoff erfolgreich „gecaged“ werden konnte; *caged*-Resact ist für weitere physiologische Messungen sehr wertvoll.

3.2.3 Kinetische Messungen der Resact-induzierten Änderung des pH-Werts

Das Modell des SAP-induzierten Signalwegs (Abb. 1.3) geht davon aus, dass der Anstieg des pH-Werts eine Voraussetzung für den Ca^{2+} -Einstrom ist. Demnach müsste der pH-Anstieg vor dem Ca^{2+} -Einstrom beginnen. Diese Voraussage soll im folgenden Kapitel mit Hilfe von zeitlich aufgelösten pH-Messungen untersucht werden.

3.2.3.1 Abhängigkeit des pH-Signals von der Resact-Konzentration

BCECF-beladene Spermien wurden mit verschiedenen Resact-Konzentrationen stimuliert und die pH-Änderung wurde zeitlich aufgelöst gemessen. Wie schon unter 3.1.2.2.5 beschrieben, hängt die Form der pH-Signale vom Zeitpunkt der Messung während der Laichzeit ab. In Abb. 3.36a, b, c, d sind pH-Signale gezeigt, die in verschiedenen Phasen der Laichzeit aufgenommen wurden. Unabhängig vom Zeitpunkt der Messung, haben die pH-Signale folgende Gemeinsamkeiten: Der pH-Wert steigt nach einer Latenz-Zeit auf ein Maximum an. Das

Maximum wird mit zunehmender Resact-Konzentration größer und sättigt bei $> 25 \text{ pM}$ Resact. Wie bei dem Ca^{2+} -Signal, verkürzen sich Latenz-Zeit und „time-to-peak“ mit der Resact-Konzentration.

Die in Abb. 3.36e gezeigten pH-Signale (25 pM Resact) stammen aus Abb. 3.36a, b, c, d und wurden auf das Maximum normiert. Der Vergleich der Signale verdeutlicht, wie sehr die Form der pH-Signale vom Zeitpunkt der Messung abhängt: Gegen Mitte der Laichzeit (Juni/Juli) ist die Latenz-Zeit und die „time-to-peak“ kürzer und die pH-Signale zeigen einen transienteren Verlauf als am Ende der Laichzeit (August). Die Latenz-Zeit wurde nur an pH-Signalen bestimmt, die gegen Ende der Laichzeit gemessen wurden (Begründung siehe 3.1.2.2.5; Schwarze Kurve). Die Latenz-Zeit beträgt bei $0,25 \text{ pM}$ Resact $\sim 1000 \text{ ms}$, wird mit zunehmender Resact-Konzentration kürzer und erreicht einen Grenzwert von $\sim 60 \text{ ms}$ bei 25 nM Resact (Abb. 3.36f).

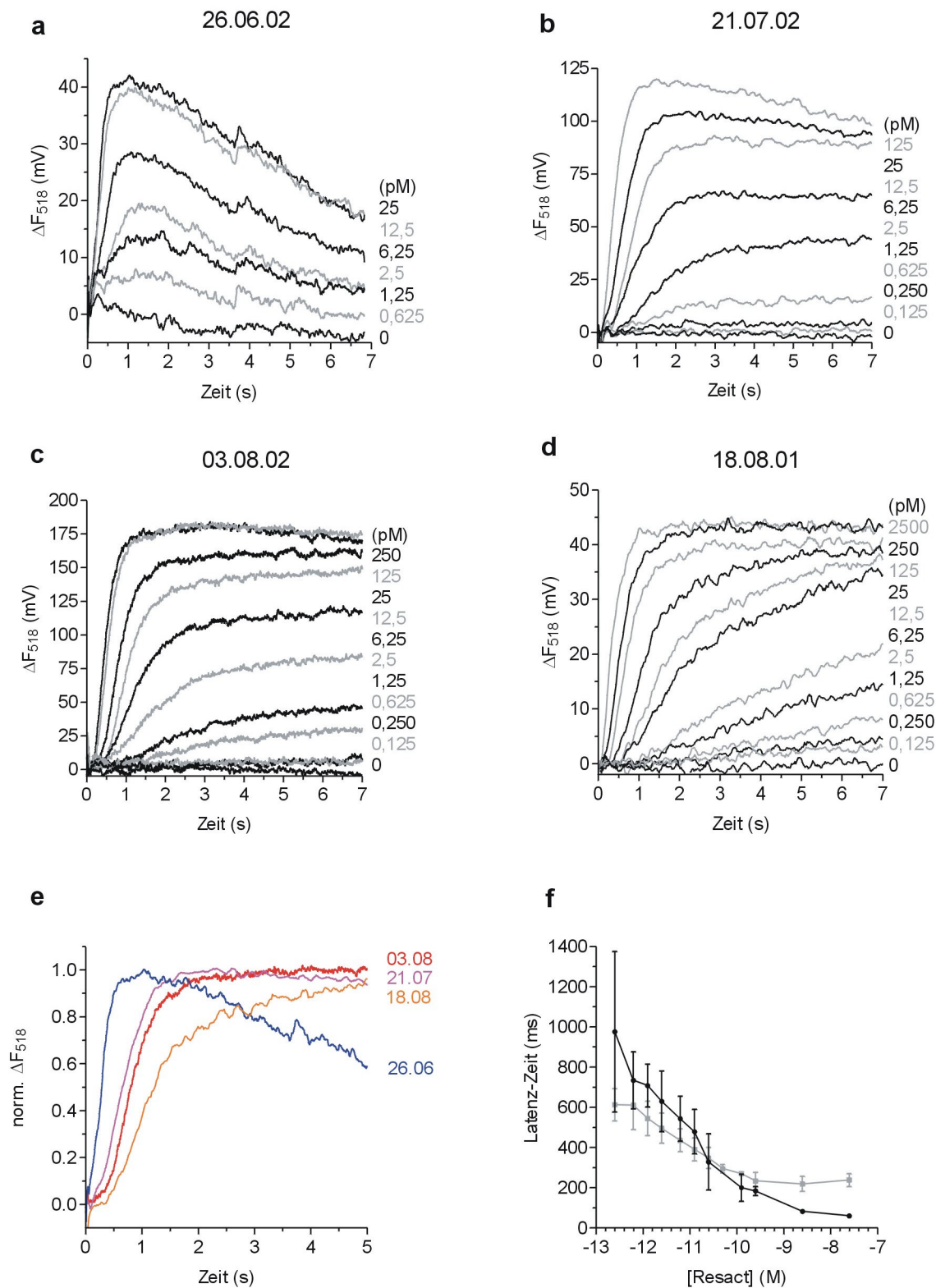


Abb. 3.36: Zeitverlauf des pH-Signals nach Stimulation der Spermien mit verschiedenen Resact-Konzentrationen. (a, b, c, d) Die Kurven zeigen den pH-Anstieg nach Stimulation mit verschiedenen Resact-Konzentrationen. Die Resact-Konzentrationen, mit denen die Spermien zum Zeitpunkt $t = 0$ stimuliert wurden, sind neben den dazugehörigen Kurven aufgetragen. Das Datum an dem die Messung durchgeführt wurde ist

jeweils über dem Graph angegeben. (e) Daten aus (a, b, c, d); normalisierter pH-Anstieg nach Stimulation mit 25 pM Resact. (f) Abhängigkeit der Latenz-Zeit des pH-Anstiegs und des Ca^{2+} -Einstroms (Erklärung siehe nächstes Kapitel) von der Resact-Konzentration. Die Latenz-Zeit wurde bestimmt am Schnittpunkt von der Regressionsgeraden der Steigung des Signals mit der Zeit-Achse.

3.2.3.2 Das Resact-induzierte pH-Signal löst nicht den Ca^{2+} -Einstrom aus

In dem Modell von Cook & Babcock (1993b) reguliert der pH-Anstieg den Ca^{2+} -Einstrom. Wenn dieses Modell stimmt, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Der pH-Anstieg muss dem Ca^{2+} -Signal vorausgehen.
2. Wenn das pH-Signal unterdrückt wird (z.B. mit intrazellulären pH-Puffern oder Protonophoren), sollte das Ca^{2+} -Signal ebenfalls unterdrückt werden.

In diesem Kapitel beschreibe ich drei unterschiedliche Experimente, die zeigen, dass der Ca^{2+} -Einstrom nicht durch den pH-Anstieg ausgelöst wird.

Erstens, vergleicht man die Latenz-Zeit des pH-Anstiegs (siehe 3.2.3.1) mit der des Ca^{2+} -Einstroms, so erkennt man, dass nur bei unphysiologisch hohen Resact-Konzentrationen $> 25 \text{ pM}$ die Latenz-Zeit des pH-Signals kürzer als die des Ca^{2+} -Signals ist (Abb. 3.36f). Daraus muss man schließen, dass zumindest der frühe Ca^{2+} -Einstrom nicht durch den pH-Anstieg ausgelöst wird. Diese Schlussfolgerung wird dadurch unterstützt, dass sich die Latenz-Zeit des pH-Signals im Laufe der Laichzeit ändert (Abb. 3.36e; Details siehe 3.1.2.2.5), das Ca^{2+} -Signal jedoch nicht. Zwar ist zu Beginn der Laichzeit auch bei niedrigen Resact-Konzentrationen die Latenz-Zeit des pH-Signals kürzer als die des Ca^{2+} -Signals, würde der pH-Anstieg aber den Ca^{2+} -Einstrom auslösen, dann müsste sich auch das Ca^{2+} -Signal im Laufe der Laichzeit verändern.

Zweitens, in Abb. 3.13 wurde gezeigt, dass 20 mM des pH-Puffers Imidazol den Resact-induzierten pH-Anstieg unterdrückt. Ich untersuchte, ob 20 mM Imidazol auch den Ca^{2+} -Einstrom verändern (Abb. 3.37a). Die Basalfluoreszenz wird nicht durch Imidazol beeinflusst. Der Resact-induzierte Ca^{2+} -Einstrom ist in Anwesenheit von Imidazol sogar etwas größer als in Abwesenheit des pH-Puffers. Dies liegt vermutlich daran, dass durch Imidazol der pH-Wert in den Spermien erhöht wird. Die Ca^{2+} -Signale werden nämlich mit zunehmendem pH-Wert etwas größer (Daten nicht gezeigt).

Drittens, in Abb. 3.14 wurde gezeigt, dass schon eine 2 min lange Inkubation mit 10 μM des Protonophors FCCP den Resact-induzierten pH-Anstieg unterdrückt. Ich untersuchte das Ca^{2+} -Signal in Spermien, die unterschiedlich lange mit 10 μM FCCP inkubiert wurden (Abb.

3.37b). Nach einer 2 min langen Inkubation mit 10 μM FCCP verdoppelt sich die Latenz-Zeit des Ca^{2+} -Einstroms. Der sonstige Zeitverlauf des Signals ändert sich jedoch kaum. Mit zunehmender Inkubationsdauer wird das Signal allerdings kleiner und langsamer, aber selbst nach einer 10 min langen Inkubation mit FCCP ist immer noch ein deutlicher Ca^{2+} -Einstrom zu erkennen. Vermutlich wird der Ca^{2+} -Einstrom nach längerer Inkubation mit FCCP langsamer und kleiner, weil der Protonengradient über der Mitochondrienmembran zusammenbricht. Dadurch kann nicht mehr GTP für die cGMP-Synthese gebildet werden.

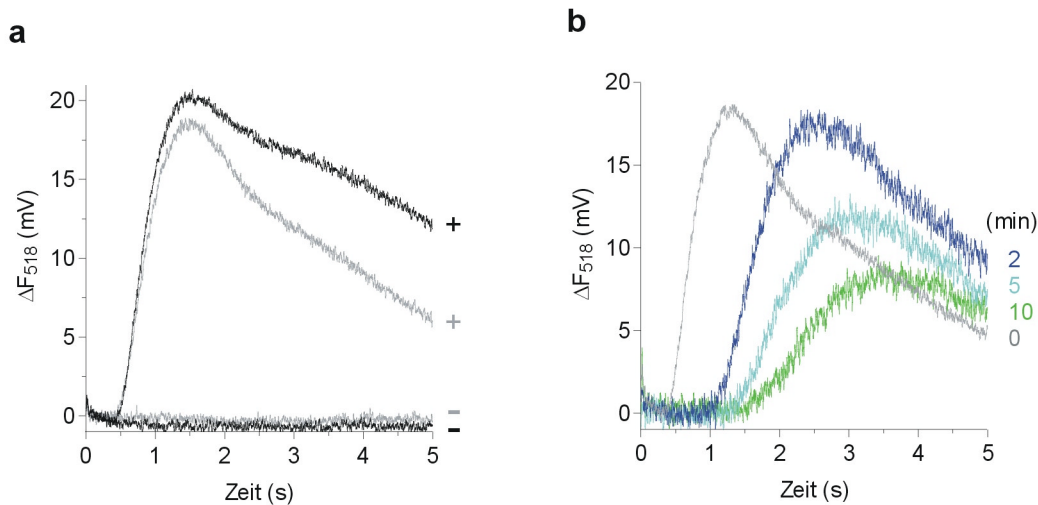


Abb. 3.37: Ca^{2+} -Signal in An- und Abwesenheit von Imidazol oder FCCP. (a) Fluo-4-beladene Spermien wurden ~ 5 min mit 20 mM Imidazol inkubiert und zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 6,25 pM (+) oder ohne (-) Resact und 20 mM Imidazol gemischt (schwarze Signale). Als Kontrolle wurden Fluo-4-beladene Spermien ohne Imidazol zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 6,25 pM Resact gemischt (graue Signale). (b) Fluo-4-beladene Spermien wurden unterschiedlich lange mit 10 μM FCCP inkubiert und zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 6,25 pM Resact stimuliert. Die Dauer der Inkubationszeit ist in den Farben der dazugehörigen Kurven angegeben.

3.2.4 Pharmakologie der Ca^{2+} -Signale

Im folgenden Kapitel werden Ca^{2+} -Messungen beschrieben, die in Gegenwart von verschiedenen Kanalblockern und Inhibitoren von Proteinkinasen durchgeführt wurden.

3.2.4.1 Wird das Ca^{2+} -Signal durch K^{+} -Kanalblocker unterdrückt?

Verschiedene Arbeiten berichten, dass SAPs durch einen K^{+} -Ausstrom eine Hyperpolarisation auslösen (Lee *et al.*, 1986; Babcock *et al.*, 1992; Cook & Babcock, 1993a, Beltran *et al.*, 1996), die durch einen cGMP-regulierten K^{+} -Kanal vermittelt wird (Galindo *et al.*, 2000). Galindo und Mitarbeiter (2000) haben eine große Zahl von K^{+} -Kanalblockern getestet, von denen nur wenige die Hyperpolarisation unterdrückten. Selbst nach einer 5-minütigen Inkubation mit 30 mM des K^{+} -Kanalblockers TEA konnte kein Effekt auf die SAP-induzierte Hyperpolarisation gezeigt werden. Die Hyperpolarisation konnte nach 5-minütiger Inkubation mit 5 mM des Kanalblockers 4-AP (4-Aminopyridin) zu 64 % inhibiert werden.

In keiner der Arbeiten konnte die Hyperpolarisation überzeugend nachgewiesen werden. Da die Hyperpolarisation eine Voraussetzung für den Ca^{2+} -Einstrom sein soll, habe ich untersucht, ob TEA und 4-AP den Ca^{2+} -Einstrom unterdrücken.

Zunächst inkubierte ich die Spermien mit 5 bis 10 mM TEA und stimulierte sie mit 12,5 pM Resact. Ich konnte keine Veränderung des Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstroms beobachten (Daten nicht gezeigt). Als nächstes inkubierte ich die Spermien mit 10 mM 4-AP und stimulierte sie mit 12,5 pM Resact (Abb. 3.38).

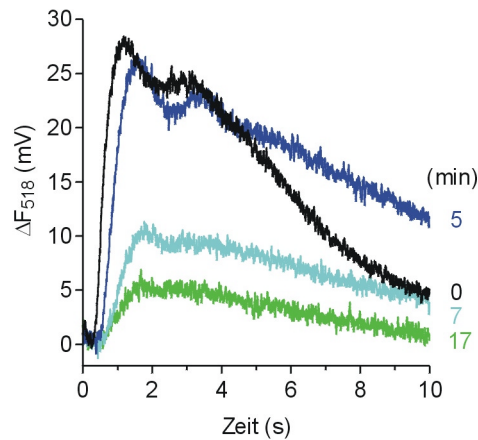


Abb. 3.38: Resact-induzierter Ca^{2+} -Einstrom nach unterschiedlich langen Inkubationen der Spermien mit 4-AP. Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 12,5 pM Resact stimuliert, nachdem sie zuvor unterschiedlich lange mit 10 mM 4-AP inkubiert worden waren. Die Inkubationszeiten sind in den Farben der dazugehörigen Kurven angegeben.

Nachdem die Spermien 5 min mit 4-AP inkubiert waren, geht das Ca^{2+} -Signal, nachdem es das Maximum erreicht hat, nicht mehr so schnell auf die Basalfluoreszenz zurück. Nach 7 min hat sich die Amplitude des Signals um mehr als das Doppelte verringert. Nach 17 min ist immer noch ein deutliches Signal zu erkennen, die Amplitude ist allerdings ~ 5 -mal kleiner als die Amplitude der Kontrolle. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass schon micromolare Konzentrationen von 4-AP K^+ -Kanäle inhibieren (Campbell *et al.*, 1993; Castle & Slawsky, 1993; Gomez & Nasi, 1994). Daher deuten die Ergebnisse darauf hin, dass 4-AP eher indirekt den Signalweg beeinflusst, als dass es spezifisch einen Resact-aktivierten K^+ -Kanal blockiert.

3.2.4.2 Ist der SPIH-Kanal an der Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms beteiligt?

Gauss und Mitarbeiter (1998) identifizierten einen hyperpolarisationsaktivierten, cAMP-modulierten Ionenkanal. Dieser sogenannte SPIH-Kanal wurde in Flagellen von *S. purpuratus*-Spermien lokalisiert. Wird das Kanalprotein in einer menschlichen Zelllinie heterolog exprimiert, so kann der Einwärtsstrom durch Cs^+ -Konzentrationen ≥ 3 mM nahezu vollständig blockiert werden. Ich untersuchte den Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in Anwesenheit von 5 mM Cs^+ , um herauszufinden, ob der SPIH-Kanal an der Regulation des Ca^{2+} -Einstroms

beteiligt ist (Daten nicht gezeigt). Es konnte kein Effekt von Cs^+ beobachtet werden. Dafür kommen drei mögliche Erklärungen in Betracht:

1. Der SPIH-Kanal ist nicht an der Regulation des Eizellpetid-induzierten Ca^{2+} -Einstroms beteiligt.
2. Der SPIH-Kanal wird in Spermien nicht durch 5 mM Cs^+ -Ionen blockiert.
3. Eher unwahrscheinlich ist, dass der Kanal nur in *S. pupuratus*-Spermien, nicht aber in *A. punctulata*-Spermien vorkommt.

3.2.4.3 Welcher Ca^{2+} -Kanal ist an dem Signalweg beteiligt?

Bisher ist es nicht gelungen, die Ca^{2+} -Kanäle zu identifizieren, die an dem Resact-induzierten Signalweg beteiligt sind.

Um zu untersuchen, ob der Resact-induzierte Ca^{2+} -Einstrom von spannungsaktivierten L-Typ Ca^{2+} -Kanälen getragen wird, wurden die Ca^{2+} -Signale in Anwesenheit des Inhibitors D-cis-Diltiazem gemessen. D-cis-Diltiazem-Konzentrationen von 10 bis 100 μM veränderten den Ca^{2+} -Einstrom nicht (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis zeigt, dass der Resact-induzierte Ca^{2+} -Einstrom wahrscheinlich nicht durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle getragen wird.

Inkubiert man die Spermien mit 30 μM des T-Typ Ca^{2+} -Kanalblockers Flunarizin, so verändert sich der Zeitverlauf des Ca^{2+} -Signals (Abb. 3.39). Unabhängig von der Resact-Konzentration bleibt die Latenz-Zeit gleich, aber die Ca^{2+} -Konzentration steigt langsamer an. Ebenso fällt das frühe Ca^{2+} -Signal langsamer ab. Die Beobachtungen zeigen, dass ein T-Typ Ca^{2+} -Kanal an dem frühen Ca^{2+} -Einstrom beteiligt sein könnte.

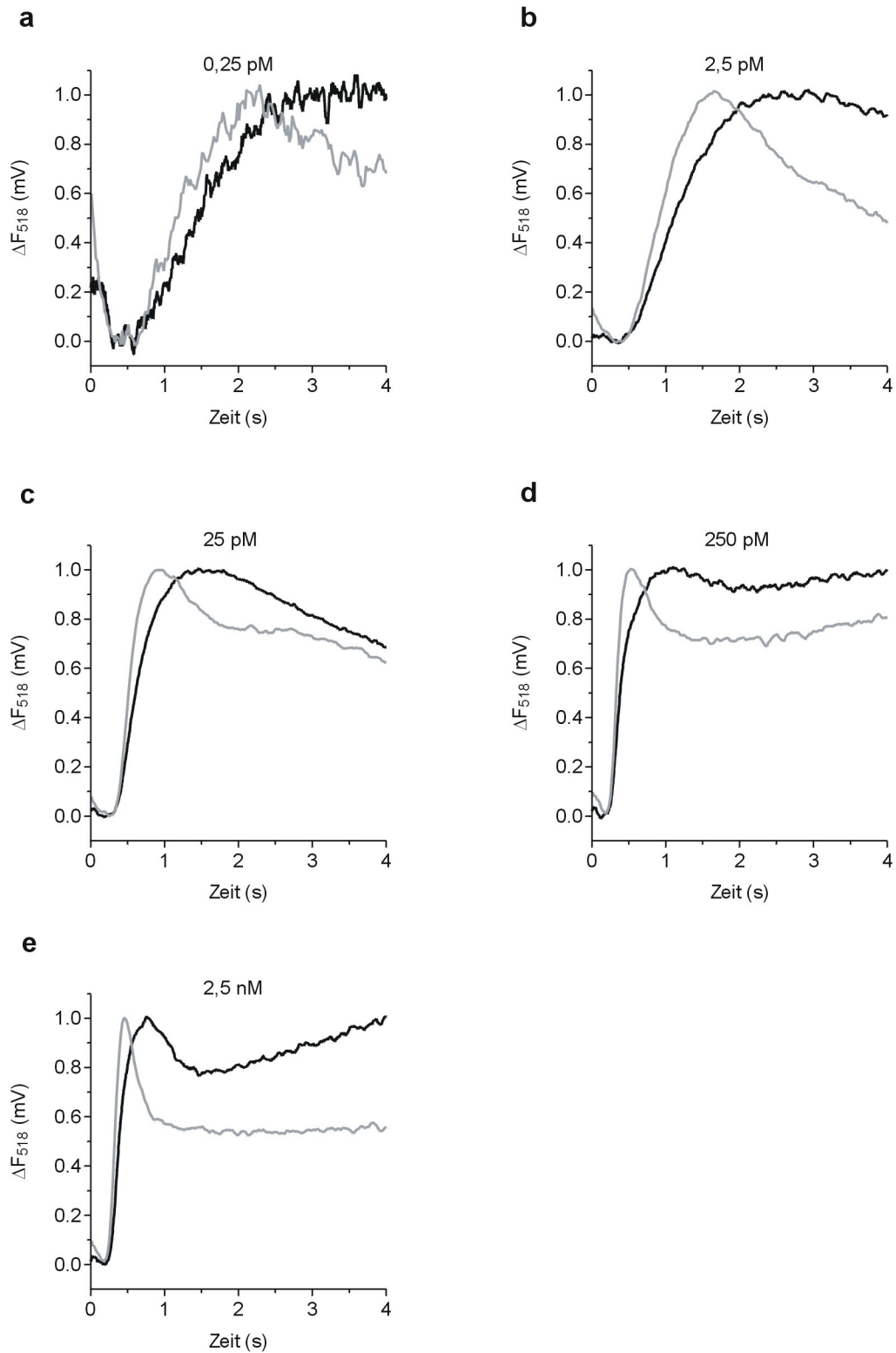


Abb. 3.39: Resact-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Anwesenheit von Flunarizin. Spermien wurden mit 30 μ M Flunarizin (schwarze Kurven) bzw. ohne Flunarizin (graue Kurven) inkubiert und zum Zeitpunkt $t = 0$ mit den angegebenen Resact-Konzentration stimuliert.

3.2.4.4 Regulieren Proteinkinasen den Ca^{2+} -Einstrom?

Resact induziert eine Zunahme der cAMP- bzw. cGMP-Konzentration. Einige Proteinkinasen (PK-A bzw. PK-G) werden durch cAMP bzw. cGMP aktiviert (zur Übersicht siehe Tasken *et al.*, 1997; Lincoln & Cornwell, 1993). Es ist möglich, dass diese Proteinkinasen entsprechende Ca^{2+} -Kanäle phosphorylieren und auf diese Weise an der Regulation des Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstroms beteiligt sind. Ich untersuchte diese Möglichkeit indem ich Spermien mit Inhibitoren für PK-A oder PK-G inkubierte und den Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstrom beobachtete (Abb. 3.40).

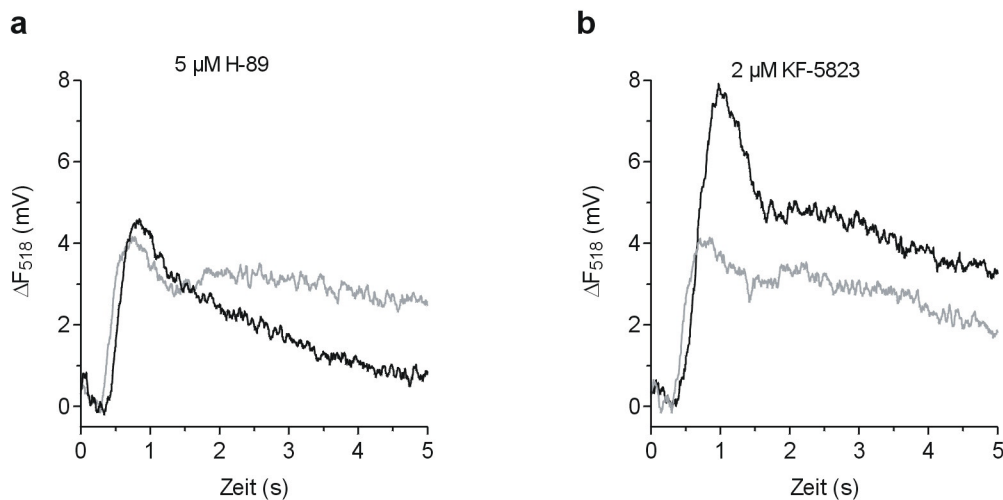


Abb. 3.40: Resact-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Anwesenheit von Proteinkinase-A- oder Proteinkinase-G-Inhibitoren. (a) Spermien wurden mit 5 μM des Proteinkinase-A-Inhibitors H-89 (schwarze Kurve) bzw. ohne H-89 (graue Kurve) inkubiert und zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 25 pM Resact stimuliert. (b) Spermien wurden mit 2 μM des Proteinkinase-G-Inhibitors KF-5823 (schwarze Kurve) bzw. ohne KF-5823 (graue Kurve) inkubiert und zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 25 pM Resact stimuliert.

In Anwesenheit des Proteinkinase-A-Inhibitors H-89 (5 μM) verlängert sich die Latenz-Zeit um ~ 100 ms und der „Buckel“ des späten Ca^{2+} -Einstroms wird unterdrückt (Abb. 3.40a). In Anwesenheit des Proteinkinase-G-Inhibitors KF-5823 (2 μM) verdoppelt sich die Signalamplitude verglichen mit der Kontrolle (Abb. 3.40b).

Aus den Beobachtungen kann man schlussfolgern, dass beide Typen von Proteinkinasen an der Regulation des Ca^{2+} -Einstroms beteiligt sind. Während Proteinkinase-A den späten Ca^{2+} -Einstrom zu aktivieren scheint, ist Proteinkinase-G an der Regulation der Amplitude des frühen Ca^{2+} -Einstroms beteiligt. Proteinkinase-G scheint jedoch nicht für die Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms notwendig zu sein.

4.1 Wozu sind zeitlich aufgelöste Messungen an intakten Spermien notwendig?

Werden Spermien des Seeigels *Arbacia punctulata* mit Resact stimuliert, so ändern sich die cGMP- bzw. die cAMP-Konzentration, die Ca^{2+} -Konzentration und der pH-Wert. Die Abfolge der physiologischen Reaktionen und ihre ursächlichen Zusammenhänge waren bisher nicht genau bekannt. Ein Grund dafür ist, dass die bisher eingesetzten Methoden nicht erlaubt haben die Spermien schnell mit dem SAP zu mischen. Die SAP-induzierten physiologischen Reaktionen verlaufen jedoch schnell, d.h. in wenigen Sekunden oder sogar Millisekunden. Um dieses Problem zu lösen, verwendete ich die *Quenched*- und die *Stopped-Flow*-Methode. Diese Methoden werden häufig eingesetzt, um chemische oder biochemische Reaktionen in Lösung im Millisekunden- bis Sekundenbereich kinetisch zu verfolgen. Bisher sind nur wenige Arbeiten bekannt, in denen physiologische Reaktionen in eukaryotischen Zellen mit diesen Methoden untersucht worden sind. So wurde der Duftstoff-induzierte Anstieg der cAMP- und IP_3 -Konzentration in Säugetier-Riechzellen durch *Quenched-Flow*-Messungen untersucht (Breer *et al.*, 1990; Boekhoff *et al.*, 1990). Nishigaki und Mitarbeiter (2001) veröffentlichten *Stopped-Flow*-Messungen des Speract-induzierten Ca^{2+} - und pH-Anstiegs in *Strongylocentrotus purpuratus*-Spermien. In beiden Arbeiten wurde jedoch nicht an intakten Zellen gemessen. Statt an Riechzellen wurde nur an Zilienpräparationen gemessen; bei den Messungen an Spermien war die Motilität der Zellen beeinträchtigt und bei < 10 % der Spermien wurden die Köpfe abgetrennt. Authentische Konzentrationsänderungen intrazellulärer Botenstoffe sollte man jedoch am Besten an intakten Zellen messen. Ich konnte zeigen, dass weder bei den cGMP- und cAMP-Messungen noch bei den Ca^{2+} - und pH-Messungen die Spermien geschädigt werden.

Mit der *Quenched*- bzw. *Stopped-Flow*-Methode wurde es erstmals möglich, die SAP-induzierten physiologischen Reaktionen an intakten Spermien zeitlich aufgelöst zu messen. Anhand der Messungen konnten Rückschlüsse auf die ursächlichen Zusammenhänge der einzelnen Reaktionen gezogen werden und die bisherigen Modelle

des SAP-induzierten Signalwegs in wesentlichen Punkten widerlegt werden. Des Weiteren lieferten die Messungen Einblicke in bisher unbekannte Details des Signalwegs.

4.2 Optimierung und Probleme der Messmethoden

4.2.1 Beladung der Spermien mit Fluoreszenzindikatoren

Verglichen mit bisherigen Ca^{2+} -Messungen an Spermien wurde in dieser Arbeit nicht nur ein besserer Ca^{2+} -Indikator eingeführt, sondern auch die Beladung der Spermien mit dem Indikator deutlich verbessert.

Wahl des Indikators.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Solzin, 1999) wurde erstmals Fluo-4 für Ca^{2+} -Messungen an Seeigel-Spermien verwendet. Bei früheren Messungen setzte man andere Ca^{2+} -Indikatoren, z.B. Indo-1 oder Fura-2, ein (z.B. Schackmann & Chock, 1986 bzw. Cook & Babcock, 1993b). Verglichen mit Indo-1 oder Fura-2 hat Fluo-4 den Vorteil, dass es in seiner Ca^{2+} -gebundenen Form wesentlich stärker als in seiner Ca^{2+} -freien Form fluoresziert. Auf Grund dieser Eigenschaft erreicht man mit Fluo-4, bei gleicher intrazellulärer Indikator-Konzentration wie Indo-1 oder Fura-2, ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis und eine geringere Hintergrundsfluoreszenz. Ein weiterer Vorteil von Fluo-4 ist, dass es durch sichtbares Licht angeregt wird, während Indo-1 und Fura-2 durch UV-Licht angeregt werden. Von Hamster-Spermien ist z.B. bekannt, dass UV-Licht die akrosomale Exozytose induzieren kann (Shirakawa & Miyazaki, 1999).

Inkubationspuffer.

In bisherigen Messungen wurden die Spermien mit den Ca^{2+} - und pH-Indikatoren in unphysiologischem ASW beladen (z.B. Nishigaki *et al.*, 2001; ASW7,0L mit pH7,0 und 1 mM Ca^{2+}). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Beladung in ASW7,0L den Zeitverlauf des Ca^{2+} -Signals verändert. Deshalb wurde normales ASW für die Beladung mit den Indikatoren verwendet, um möglichst authentische Signale messen zu können.

Signal-Rausch-Verhältnis.

Sowohl die Ca^{2+} -Signale als auch die pH-Signale zeigen ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis (z.B. bei 25 nM Resact > 100). Selbst bei 250 fM Resact können noch Ca^{2+} - bzw. pH-Signale mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von ~ 7 bzw. ~ 2 gemessen werden. Dagegen mussten Nishigaki und Mitarbeiter (2001) selbst bei sättigenden Speract-Konzentrationen 140 Ca^{2+} -Signale mitteln, um ein Signal-Rausch-Verhältnis von ~ 4 zu bekommen. Ein einzelnes Signal hatte also ein Signal-Rausch-Verhältnis von $\sim 0,3$. Vermutlich liegt dieser große Unterschied daran, dass die Spermien bei den Messungen von Nishigaki und Mitarbeitern (2001) geschädigt wurden und die optischen Eigenschaften des Messstandes nur unzureichend waren. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass ich im Rahmen meiner Diplomarbeit mit einer 80-mal geringeren Speract-Konzentration (2,5 nM) ohne zu mitteln ein Signal-Rausch-Verhältnis von ~ 18 erreichte (Solzin, 1999).

Fazit: Das verbesserte Beladungsprotokoll erlaubt es, möglichst authentische Ca^{2+} - und pH-Signale an ungeschädigten Spermien mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis zu messen.

4.2.2 Kalibrierung der Ca^{2+} -Konzentration bzw. des pH-Werts

Bei den *Stopped-Flow*-Messungen wurde aus folgenden Gründen nur die *Änderungen* der Ca^{2+} -Konzentration bzw. des pH-Werts, nicht aber die *absolute* Ca^{2+} -Konzentration bzw. der pH-Wert gemessen:

Die Resact-Rezeptoren sind im Flagellum der Spermien lokalisiert (Sano, 1976). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Resact-induzierten Reaktionen nicht homogen über das ganze Spermium, sondern räumlich begrenzt stattfinden. Da bei den *Stopped-Flow*-Messungen die Fluoreszenz einer Spermienpopulation gemessen wird, repräsentieren die Messsignale einen Durchschnitt der Fluoreszenzsignale aller Kompartimente wie z.B. Flagellen, Akrosomen und Mitochondrien. Mit den *Stopped-Flow*-Messungen würde man also die mittlere Ca^{2+} -Konzentration bzw. den mittleren pH-Wert der Spermien messen.

Eine Kalibrierung würde daher keine Rückschlüsse auf die Ca^{2+} -Konzentration bzw. auf den pH-Wert im Zytosol des Flagellums zulassen und wäre deshalb sinnlos.

4.3 Ablauf der Resact-induzierte Reaktionen in *Arbacia punctulata*-Spermien

cGMP-Anstieg.

Resact induziert einen schnellen und großen Anstieg der cGMP-Konzentration. Nach Stimulation mit 250 nM Resact steigt die cGMP-Konzentration innerhalb von 25 ms schon auf das ~ 5 -fache an. Die cGMP-Konzentration steigt schneller an als die cAMP-Konzentration, die Ca^{2+} -Konzentration und als der pH-Wert. Die Änderung der cGMP-Konzentration repräsentiert damit den ersten zellulären Schritt des Signalwegs, der die Chemotaxis kontrolliert. Dieses Ergebnis ist insofern nicht überraschend, da der Rezeptor für Resact als eine membranständige GC identifiziert wurde (Shimomura *et al.*, 1986b).

Die cGMP-Ruhekonzentration beträgt im Mittel 1,0 pmol/ 10^8 Spermien. Sie steigt nach Stimulation mit 250 nM Resact im Mittel um das ~ 20 -fache an. In früheren Studien wurden zwar vergleichbare cGMP-Ruhekonzentrationen von 0,4 - 0,6 pmol/ 10^8 Spermien gemessen, ein Anstieg der cGMP-Konzentration konnte jedoch nur in Anwesenheit von mindestens 0,05 mM des PDE-Inhibitors IBMX gemessen werden (z.B. Suzuki *et al.*, 1984; Ward *et al.*, 1985b; Shimomura & Garbers, 1986a). Trotz des PDE-Inhibitors konnte selbst mit ~ 5 μM Resact nur eine ~ 5 -fache Erhöhung der cGMP-Konzentration gemessen werden (Suzuki *et al.*, 1984). Der Unterschied zwischen den *Quenched-Flow*-Messungen und den früheren Messungen liegt an der höheren Zeitauflösung der *Quenched-Flow*-Messungen: Bei den früheren Messungen wurde das Maximum des Resact-induzierten cGMP-Anstiegs verpasst, da die cGMP-Konzentration schon wieder abnahm bevor man sie messen konnte. Ein weiterer Vorteil der *Quenched-Flow*-Methode ist, dass es durch die hohe Zeitauflösung erstmals möglich war, den cGMP-Anstieg in Spermien in Abwesenheit von IBMX zu messen.

Rechnet man die cGMP-Menge auf cGMP-Moleküle/Spermium um, so befinden sich in einem unstimulierten Spermium 2400 cGMP-Moleküle. Geht man davon aus, dass die

Komponenten des cGMP-Signalwegs nur im Zytosol lokalisiert sind und das Zytosol < 50 % des Spermiovolumens (7 fl; Harvey *et al.*, 1956) ausmacht, so erhält man eine cGMP-Ruhekonzentration von ungefähr > 1,2 μM . Nach Stimulation mit 250 nM Resact würde die cGMP-Konzentration auf 86 μM bzw. 180.000 cGMP-Moleküle/Spermium ansteigen. Im Vergleich dazu beträgt die cGMP-Ruhekonzentration in Photorezeptoren 50 – 60 μM (zur Übersicht siehe Kaupp & Koch, 1992). Die freie, im Zytoplasma vorliegende cGMP-Konzentration liegt jedoch nur bei 2 – 4 μM . Die restlichen cGMP-Moleküle sind an hoch-affine Bindungsstellen, wie z.B. PDEs gebunden. Nach moderater Licht-Stimulation nimmt die gesamte cGMP-Konzentration um nur 10 – 15 % ab. Die Änderung der freien cGMP-Konzentration ist dagegen wesentlich größer. Es ist anzunehmen, dass in Spermien die freie cGMP-Konzentration durch hoch-affine Bindungsstellen wesentlich verringert wird. Mit den RIAs kann man jedoch nicht zwischen der freien und der gebundenen cGMP-Konzentration unterscheiden, sondern nur die Gesamt-Konzentration bestimmen. Bei Resact-Konzentrationen < 250 pM wird der Anstieg freien cGMP-Konzentration verglichen zur Gesamt-Konzentration so gering sein, dass man ihn auf Grund der mangelnden Empfindlichkeit der RIAs nicht mehr messen kann.

Zwei Ca^{2+} -Signale.

Resact induziert zwei verschiedene Ca^{2+} -Signale – ein „frühes“ und ein „spätes“ Ca^{2+} -Signal. Das frühe Ca^{2+} -Signal scheint aus folgenden Gründen die entscheidende zelluläre Reaktion zu sein:

1. Das frühe Ca^{2+} -Signal wird schon durch ein einziges Resact-Molekül ausgelöst und sättigt, wenn etwa 50-100 Moleküle/Spermium gebunden sind. Zwei Beobachtungen sprechen dafür, dass der cGMP-Anstieg das frühe Ca^{2+} -Signal auslöst: Erstens, Ca^{2+} -Signale, die durch niedrige Resact-Konzentrationen ausgelöst werden, sind den mit *caged*-cGMP-induzierten Ca^{2+} -Signalen ähnlich, nicht aber den mit *caged*-cAMP-induzierten. Zweitens, der Resact-induzierte cAMP-Anstieg ist zumindest mit IBMX langsamer als das frühe Ca^{2+} -Signal und reagiert weniger empfindlich auf Resact als der cGMP-Anstieg.

2. Das späte Ca^{2+} -Signal wird durch höhere Resact-Konzentrationen als das frühe Ca^{2+} -Signal ausgelöst. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das späte Ca^{2+} -Signal eher durch cAMP als durch cGMP vermittelt wird. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass durch die Inhibition der cAMP-regulierten Protein-Kinase das späte Ca^{2+} -Signal blockiert wird.
3. Das Spermien-Schwimmverhalten verändert sich schon, wenn man mit einem UV-Blitz aus *caged*-Resact ~ 10 pM Resact freisetzt (Hildebrand, mündliche Mitteilung). Bei 10 pM Resact ist das späte Ca^{2+} -Signal, wenn überhaupt, nur ansatzweise zu erkennen.
4. Die Zeit, die vergeht bis Spermien auf Resact mit einer Veränderung des Schwimmverhaltens reagieren, liegt zwischen 350 und 1000 ms (Hildebrand, mündliche Mitteilung). Sie ist damit etwas länger als die Latenz-Zeit des frühen Ca^{2+} -Signals (200 bis 600 ms), aber kürzer als die Zeit bis das Maximum des frühen Ca^{2+} -Einstroms erreicht wird (1000 bis 2000 ms).
5. Die Eizelle produziert einen Konzentrationsgradienten von Resact: Direkt an der Eizelle ist die Konzentration sehr hoch; sie nimmt mit zunehmender Entfernung von der Eizelle ab. Außer in unmittelbarer Nähe der Eizelle, wird das Spermium nur niedrigen Resact-Konzentrationen ausgesetzt (Cook *et al.*, 1994). Diese geringen Resact-Konzentrationen können nur das frühe Ca^{2+} -Signal auslösen. Daher werden niedrige Resact-Konzentrationen in erster Linie für die Kontrolle des chemotaktischen Verhaltens verantwortlich sein.
6. Garbers (1981) zeigte, dass sich die Komponenten des cAMP-Signalwegs eher im Kopf des Spermiums lokalisiert sind, während sich die Komponenten für den cGMP-Signalweg im Flagellum befinden. Daraus könnte man schließen, dass cGMP über das frühe Ca^{2+} -Signal das chemotaktische Verhalten reguliert, während cAMP über den späten Ca^{2+} -Einstrom die akrosomale Exozytose vorbereiten könnte.

Welcher Typ von Ionenkanal vermittelt den Ca^{2+} -Einstrom?

Sowohl mit Hilfe von *caged*-cGMP als auch von *caged*-cAMP kann ein Ca^{2+} -Einstrom aktiviert werden. Die Vermutung liegt daher nahe, dass der Ca^{2+} -Einstrom von zyklisch-

Nukleotid-gesteuerten Kanälen (CNG-Kanälen) getragen wird. CNG-Kanäle leiten sehr gut Ca^{2+} -Ionen (Picones & Korenbrot, 1995; Frings *et al.*, 1995; Dzeja *et al.*, 1999) und werden sowohl durch cAMP als auch durch cGMP aktiviert (zur Übersicht, siehe Kaupp & Seifert, 2002). Die Latenz-Zeit, die vergeht bis es zu einem Ca^{2+} -Einstrom in Spermien kommt, ist jedoch zu lange, als dass der Ca^{2+} -Einstrom von CNG-Kanälen getragen werden könnte. Ströme, durch CNG-Kanäle, weisen eine kürzere oder keine Latenz-Zeit auf, wenn die CNG-Kanäle mit Hilfe von *caged*-zyklischen Nukleotiden schnell aktiviert werden (Dzeja *et al.*, 1999). Die lange Latenz-Zeit weist darauf hin, dass entweder cAMP bzw. cGMP direkt einen Ca^{2+} -Kanal öffnen, der eine lange Aktivierungszeit hat, oder dass weitere Zwischenschritte benötigt werden, um den Ca^{2+} -Kanal in *A. punctulata*-Spermien zu aktivieren.

Es wird auch spekuliert, dass der Ca^{2+} -Einstrom von spannungs-regulierten Ca^{2+} -Kanälen getragen wird (Schackmann & Chock, 1986; Cook & Babcock, 1993). D-cis-Diltiazem, ein Inhibitor von spannungs-regulierten L-Typ Ca^{2+} -Kanälen, zeigte jedoch keinen Effekt. Dagegen veränderte der T-Typ Ca^{2+} -Kanal-Inhibitor Flunarizin den Zeitverlauf des Ca^{2+} -Einstroms. Flunarizin unterdrückt den Ca^{2+} -Einstrom jedoch nicht, sondern verlangsamt nur den Anstieg und die Abnahme des frühen Ca^{2+} -Einstroms. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ein T-Typ Ca^{2+} -Kanal daran beteiligt ist, die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Einstroms zu regulieren.

Vor kurzem wurden zwei mutmaßliche Kationen-Kanäle („CatSper; CatSper2“) kloniert, die im Flagellum von Mäuse-Spermien exprimiert werden (Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2001). CatSper und CatSper2 stellen die Prototypen einer bisher unbekannten Ionenkanal-Familie dar. In Spermien von *knock-out*-Mäusen, denen der CatSper-Kanal fehlt, kann kein zyklisch-Nukleotid-induzierter Ca^{2+} -Einstrom mehr ausgelöst werden (Ren *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist die Motilität der Spermien gestört. Es wäre interessant zu wissen, ob homologe Kanäle an dem Ca^{2+} -Signalweg in Seeigel-Spermien beteiligt sind.

Regulation des Ca^{2+} -Einstroms.

Babcock und Mitarbeiter (1992) behaupten, dass Speract eine Hyperpolarisation auslöst. Diese Hyperpolarisation sollte durch einen cGMP-regulierten K^+ -Kanal getragen werden und eine Voraussetzung für den Ca^{2+} -Einstrom sein (Galindo *et al.*, 2000). Der K^+ -Kanal sollte durch 4-AP blockiert werden. Würde dieser K^+ -Kanal den Ca^{2+} -Einstrom regulieren, so sollte 4-AP auch den Ca^{2+} -Einstrom blockieren. Bei Messungen des Ca^{2+} -Einstroms konnte ich jedoch keinen eindeutigen Effekt von 4-AP erkennen. Diesen Widerspruch könnte man folgendermaßen erklären: Galindo und Mitarbeiter inkubierten die Spermien 5 bis 10 min lang mit 4-AP. Auf Grund dieser langen Inkubationsdauer ist es wahrscheinlich, dass der von ihnen beobachtete Effekt auf einer unspezifischen Wirkung von 4-AP beruht. 4-AP könnte z.B. K^+ -Kanäle inhibieren, die nicht an dem Resact-induzierten Signalweg beteiligt sind. Die Inhibition von unbeteiligten K^+ -Kanälen könnte dazu führen, dass der physiologische Zustand der Spermien beeinflusst wird und damit indirekt auch der Resact-induzierte Signalweg.

Einzelmolekül-Antwort.

In dieser Arbeit wurde anhand von Spermien erstmals auf zellulärer Ebene gezeigt, dass Zellen auf einzelne Moleküle reagieren können. Spermien stellen damit extrem empfindliche Chemosenoren dar. Ob der Ca^{2+} -Einstrom, der durch ein einzelnes Resact-Molekül ausgelöst wird, jedoch eine Verhaltensänderung des Spermiums bewirkt ist nicht bekannt.

Das frühe Ca^{2+} -Signal sättigt, wenn ungefähr 100 Moleküle gebunden sind. Interessant sind die Parallelen zwischen dem Chemotaxis-aktivierten Signalweg und dem Licht-aktivierten Signalweg in Stäbchen-Sehzellen. Stäbchen sind – wie Spermien – ausgesprochen empfindlich; sie können einzelne Photonen wahrnehmen und die Lichtantwort sättigt, wenn 100 Photonen absorbiert werden (zur Übersicht, siehe Pugh & Lamb, 2000).

Ausbreitung des Ca^{2+} -Signals.

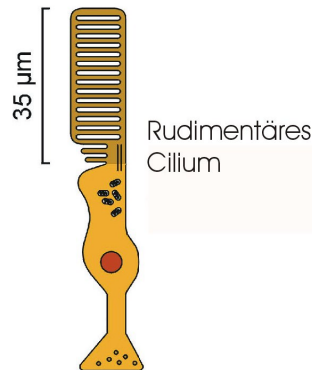
Eine weitere Parallele zwischen dem Außensegment einer Stäbchen-Sehzelle und dem Spermien-Flagellum ist, dass beide lange, dünne Zylinder sind, die 35 μM bzw. 50 – 60 μM lang sind. Diese Zylinder sind darauf spezialisiert, Licht bzw. ein Lockstoff-Molekül in ein zelluläres Signal zu wandeln. In Außensegmenten ist die Anregung durch einzelne Photonen ein lokal begrenztes Ereignis d.h., die Licht-induzierten Änderungen der cGMP-Konzentration und der Ca^{2+} -Konzentration breitet sich nur über einen bestimmten Abschnitt entlang des Außensegments aus. Die Ca^{2+} -Signale schwinden innerhalb einer Längen-Konstanten von ungefähr 4 μM (Lamb *et al.*, 1981; Gray-Keller *et al.*, 1999). Das Modell von Lamb und Mitarbeitern beschreibt sehr gut das Verhältnis zwischen der Resact-Konzentration und der Ca^{2+} -Antwort in Spermien. Treffen die Annahmen des Modells zu, dann würde bei niedrigen Resact-Konzentrationen jedes Resact-Molekül nur einen Ca^{2+} -Einstrom auslösen, der sich nur über 5 μM entlang des Flagellums ausbreitet. Der Ca^{2+} -Einstrom würde somit ein ähnliches Verhalten wie in Stäbchen aufweisen.

Adaptation.

Stäbchen können über 3-4 Größenordnungen der Lichtintensität arbeiten, indem sie ihre Empfindlichkeit durch einen Prozess, den man als Adaptation bezeichnet, reduzieren. Spermien nehmen sogar über mehr als 6 Größenordnungen der Resact-Konzentration wahr. Folglich müssen auch Spermien adaptieren. Wäre dies nicht der Fall, so würde schon eine geringe Resact-Konzentration dazu führen, dass das Spermium maximal reagiert und dadurch eine Änderung der Resact-Konzentration nicht mehr wahrnehmen könnte.

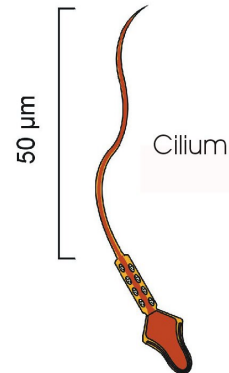
In der folgenden Abbildung werden die Eigenschaften eines Photorezeptors und eines Spermiums noch einmal vergleichend dargestellt:

Stäbchen



1. cGMP
2. nimmt einzelne Photonen wahr
3. sättigt bei weniger als 100 Photonen
4. Stimulation von Kompartimenten
5. Längenkonstante $\sim 4 \mu\text{m}$
6. Adaptation über 3-4 Größeneinheiten

Spermium



1. cGMP
2. nimmt einzelne Moleküle wahr
3. sättigt bei weniger als 100 Molekülen
4. Stimulation von Kompartimenten
5. Längenkonstante $\sim 5 \mu\text{m}$
6. ?

pH-Anstieg.

Der pH-Anstieg beginnt bei Resact-Konzentrationen $\leq 25 \text{ pM}$ später als der Ca^{2+} -Einstrom. Folglich kann der pH-Anstieg nicht den Ca^{2+} -Einstrom auslösen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu bisherigen Messungen, bei denen behauptet wurde, der pH-Anstieg löse den Ca^{2+} -Einstrom aus (Hansbrough & Garbers 1981b; Schackmann & Chock, 1986; Nishigaki *et al.*, 2001). Der Widerspruch beruht darauf, dass bei den „konventionellen“ Messungen nicht zeitlich aufgelöst gemessen wurde und dass nur hohe SAP-Konzentrationen im nanomolaren Bereich eingesetzt wurden.

Anhand weiterer Experimente konnte ich bestätigen, dass der Ca^{2+} -Einstrom nicht durch den pH-Anstieg ausgelöst wird:

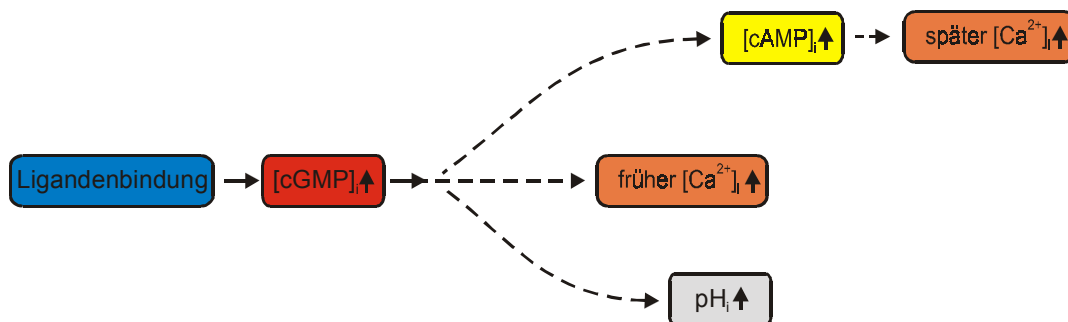
1. Während sich die Kinetik des pH-Signals im Laufe der Laichzeit ändert, bleibt die des Ca^{2+} -Einstroms unverändert.

2. Der pH-Puffer Imidazol unterdrückt zwar das pH-Signal in den Spermien, nicht jedoch den Ca^{2+} -Einstrom.
3. Der Protonophor FCCP verhindert das pH-Signal, nicht aber den Ca^{2+} -Einstrom.

Neues Modell des Resact-induzierten Signalweges

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen in verschiedenen Punkten nicht mit dem in Abb. 1.3 gezeigten Modell überein: Erstens, die Ca^{2+} -Messungen geben keinen Hinweis auf eine anfängliche Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration. Zweitens, cGMP und cAMP können unabhängig voneinander einen Ca^{2+} -Einstrom auslösen. Der Resact-induzierte cGMP-Anstieg scheint jedoch, eher als der cAMP-Anstieg, die Ursache für den frühen Ca^{2+} -Einstrom und damit für die Verhaltensänderung zu sein. Drittens, cAMP steigt während oder nach dem frühen Ca^{2+} -Einstrom an. Die Spermien sind während dem cAMP-Anstieg also eher depolarisiert als hyperpolarisiert. Eine Aktivierung der AC durch eine Hyperpolarisation ist daher unwahrscheinlich. Viertens, der pH-Anstieg ist nicht an der Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms beteiligt.

Im folgenden ist das Modell gezeigt, das aus den Ergebnissen dieser Arbeit hervorgegangen ist:



Die GC wird durch die Bindung von Resact aktiviert, wodurch es zu einem schnellen, transienten Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration kommt. Die erhöhte cGMP-Konzentration aktiviert entweder direkt oder über weitere Zwischenschritte den frühen Ca^{2+} -Einstrom. Der frühe Ca^{2+} -Einstrom ist transient, weil die Ca^{2+} -Kanäle schließen und

Ca^{2+} über einen $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Austauscher aus der Zelle transportiert wird. Der frühe Ca^{2+} -Einstrom ist für die chemotaktische Verhaltensänderung verantwortlich. Die erhöhte cGMP-Konzentration aktiviert über einen unbekannten Mechanismus eine Adenylzyklase, wodurch ein langsamer cAMP-Anstieg induziert wird. Der cAMP-Anstieg aktiviert vermutlich entweder direkt oder über weitere Zwischenschritte den späten Ca^{2+} -Einstrom. Die Funktion des späten Ca^{2+} -Einstroms ist unbekannt. Die erhöhte cGMP-Konzentration aktiviert auf unbekannte Art einen pH-Anstieg mittels eines $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers. Die Funktion des pH-Anstiegs ist unbekannt.

4.4 Asterosap-induzierte Änderung der cGMP-Konzentration in *Asterias-amurensis*-Spermien

Asterosap induziert einen sehr schnellen und großen Anstieg der cGMP-Konzentration in *A. amurensis*-Spermien. Schon nach 25 ms steigt die cGMP-Konzentration um das ~ 6-fache an. Die Schnelligkeit des cGMP-Anstiegs lässt vermuten, dass der cGMP-Anstieg allen anderen intrazellulären Vorgängen vorausgeht und daher den ersten Schritt des Asterosap-induzierten Signalwegs repräsentiert.

Die cAMP- und cGMP-Ruhekonzentrationen sind vergleichbar mit denen in *A. punctulata*-Spermien. Der Peptid-induzierte cAMP-Anstieg unterscheidet sich dagegen deutlich. Während bei *A. punctulata*-Spermien ein cAMP-Anstieg bei Resack-Konzentrationen $> 2,5$ nM zu beobachten ist, konnte bei *A. amurensis*-Spermien selbst mit 1 μM Asterosap kein cAMP-Anstieg gemessen werden. Bei Seeigel-Spermien wurde bisher davon ausgegangen, dass der cAMP-Anstieg den Ca^{2+} -Anstieg auslöst (Cook & Babcock, 1986; Cook *et al.*, 1994). Die Messungen an den *A. amurensis*-Spermien liefern keinen Hinweis darauf, dass ein cAMP-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom ein frühes Ereignis des Asterosap-induzierten Signalwegs ist. Diese Beobachtung stimmt mit meinen Messungen an *A. punctulata*-Spermien überein die zeigen, dass cAMP den frühen Ca^{2+} -Einstrom nicht auslöst. Trotz allem könnte Asterosap einen sehr langsamen cAMP-Anstieg induzieren, der erst außerhalb meiner Messdauer stattfindet.

Welche Funktion könnte der cGMP-Anstieg in den Seestern-Spermien haben? Der einzige andere Peptid-induzierte cGMP-Signalweg wurde in Spermien von *A. punctulata* nachgewiesen (Suzuki *et al.*, 1984; Ward *et al.*, 1985b; Shimomura & Garbers, 1986a). Da Resact chemotaktisch auf *A. punctulata*-Spermien wirkt, liegt es nahe zu vermuten, dass Asterosap ebenfalls chemotaktisch auf *A. amurensis*-Spermien wirkt. Diese Hypothese wird durch zwei weitere Beobachtungen unterstützt:

1. Die Sequenz von Asterosap ist sehr ähnlich mit dem N-Terminus des chemotaktisch wirksamen Proteins („Startrak“) des Seesterns *Pycnopodia helianthoides* (Miller & Vogt, 1996). Startrak ist 13 kDa groß. Es wurde aus unreifen Eizellen isoliert und stellt wahrscheinlich ein unprozessiertes Präpeptid dar. Der N-Terminus von Startrak ist ~ 130-mal stärker chemotaktisch aktiv als das komplette Protein. In der Tat zeigen Untersuchungen der Asterosap-kodierenden cDNA, dass auch Asterosap zunächst in Form von großen Präpeptiden vorliegt, die aus verschiedenen Isoformen von Asterosap bestehen (Matsumoto, 1999).
2. Der Asterosap-Rezeptor ist ausschließlich im Flagellum lokalisiert (Matsumoto M., unveröffentlichte Daten). Diese Beobachtung legt nahe, dass der Rezeptor die Spermienmotilität kontrolliert. Tatsächlich wurde gezeigt, dass nanomolare Asterosap-Konzentrationen die Schwimmgeschwindigkeit der Spermien in ASW mit niedrigem pH erhöhen (Nishigaki *et al.*, 1996). Wie die Peptide von Seeigeln, induziert Asterosap einen Ca^{2+} -Einstrom, worüber vermutlich das Schwimmverhalten kontrolliert wird (Matsumoto M., zur Veröffentlichung eingereicht).

Die Ähnlichkeit der Peptid-induzierten Signalwege in *A. amurensis*- und *A. punctulata*-Spermien unterstützen die Idee, dass cGMP-vermittelte Signalwege in Spermien evolutionär alte Prozesse sind.

Das Eizell-Peptid Resact wirkt chemotaktisch auf Spermien des Seeigels *Arbacia punctulata*. Resact bindet an eine membranständige Rezeptor-Guanylylzyklase auf dem Flagellum und aktiviert so eine Signalkaskade. Dies führt dazu, dass die cGMP-/cAMP-Konzentrationen, die Ca^{2+} -Konzentration, sowie der pH-Wert ansteigen. Die zeitliche Abfolge und damit die kausalen Zusammenhänge der einzelnen physiologischen Reaktionen waren bisher unbekannt. Aus diesem Grund wurden im Rahmen meiner Arbeit zwei Methoden eingeführt, mit denen es möglich ist, die einzelnen Reaktionen zeitlich aufgelöst - d.h. im Millisekunden-Maßstab - zu messen. Der Verlauf der cGMP- und cAMP-Konzentration wurde mit der *Quenched-Flow*-Methode bestimmt. Dazu wurde diese Methode mit cGMP- bzw. cAMP-Radioimmunoassays kombiniert. Der Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration und des pH-Werts wurde mit der *Stopped-Flow*-Methode gemessen. Diese Methode wurde mit einem fluorimetrischen Messsystem kombiniert, um mit Hilfe intrazellulärer Ca^{2+} - bzw. pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe die Ca^{2+} -Konzentration bzw. den pH-Wert messen zu können. Beide Methoden ermöglichten es erstmals die zeitliche Abfolge der einzelnen Reaktionen zu bestimmen.

Die Messungen zeigen, dass Resact einen extrem schnellen und großen Anstieg der cGMP-Konzentration hervorruft. Die cGMP-Konzentration beginnt innerhalb der ersten 25 ms anzusteigen und erreicht ihren halb-maximalen Wert schon nach < 200 ms. Während schon picomolare Resact-Konzentrationen einen Anstieg der cGMP-Konzentration auslösen, steigt die cAMP-Konzentration erst bei nanomolaren Resact-Konzentrationen an. Des Weiteren ist der cAMP-Anstieg, verglichen mit dem cGMP-Anstieg, wesentlich kleiner und langsamer.

Ungefähr 250 ms nach der Resact-Stimulation beginnt ein Ca^{2+} -Einstrom. Der Ca^{2+} -Einstrom setzt sich aus einem „frühen“ und einem „späten“ Ca^{2+} -Signal zusammen. Das frühe Ca^{2+} -Signal kann schon durch einzelne Resact-Moleküle ausgelöst werden, während das späte Ca^{2+} -Signal erst durch höhere Resact-Konzentrationen ausgelöst wird. Der cGMP-Anstieg aktiviert entweder direkt oder über weitere Zwischenschritte das frühe Ca^{2+} -Signal. Der cAMP-Anstieg ist zumindest in Anwesenheit des PDE-Inhibitors IBMX langsamer als das frühe Ca^{2+} -Signal und kann daher höchstens das späte Ca^{2+} -Signal

auslösen. Im Gegensatz zum späten Ca^{2+} -Signal, findet das frühe Ca^{2+} -Signal zeitgleich mit der Resact-induzierten Änderung des Schwimmverhaltens statt. Das frühe Ca^{2+} -Signal stellt daher die entscheidende Reaktion in der Resact-induzierten Signalkaskade dar.

Das pH-Signal reagiert, wie das Ca^{2+} -Signal, auf Resact-Konzentrationen über mehr als 6 Größenordnungen. Die Latenz-Zeit des pH-Signals ist nur bei hohen Resact-Konzentrationen kürzer als die des Ca^{2+} -Signals. Bei niedrigen Resact-Konzentrationen beginnt das pH-Signal nach dem Ca^{2+} -Einstrom. Dieses Ergebnis zeigt, dass der pH-Anstieg nicht den Ca^{2+} -Einstrom aktiviert.

Des Weiteren wurde mit *Quenched-Flow*-Messungen gezeigt, dass Asterosap in *Asterias amurensis*-Spermien einen extrem schnellen und großen Anstieg der cGMP-Konzentration auslöst, während es zu keinem cAMP-Anstieg kommt. Diese Messungen unterstützen andere Messungen, die zeigten, dass der Rezeptor für Asterosap - wie der Resact-Rezeptor - eine GC ist und dass cAMP für eine schnelle Änderung des Schwimmverhaltens unwesentlich zu sein scheint.

Die Messungen des cNMP-Anstiegs, des Ca^{2+} -Einstroms und des pH-Anstiegs widerlegen wesentliche Punkte des bisherigen Signalkaskaden-Modells. Durch zeitlich aufgelöste Messungen des Membranpotentials könnte man weitere Einblicke in den Ablauf der Signalkaskade bekommen. Dazu könnte die *Stopped-Flow*-Methode kombiniert mit Membranpotential-sensitiven Fluoreszenzindikatoren eingesetzt werden. Spermien können auf Resact-Konzentrationen über mehr als 6 Größenordnungen reagieren. Folglich muss es einen Adaptationsmechanismus geben, da sonst die Spermien schon bei geringen Resact-Konzentrationen keine Konzentrationsunterschiede mehr wahrnehmen könnten. Es wäre interessant herauszufinden, wie die Adaptation funktioniert. Dazu könnte man Spermien mit einer bestimmten Resact-Konzentration inkubieren („conditioning pulse“). Anschließend stimuliert man diese Spermien erneut mit Resact („test-pulse“) und misst das Ca^{2+} -Signal. Auf diese Weise könnte man untersuchen, wie das Ca^{2+} -Signal des „test-pulse“ von der Höhe des „conditioning-pulse“ abhängt. Des Weiteren könnte man bei diesen Messungen sowohl die Zeit zwischen den beiden Stimuli verändern. Auf diese Weise könnte man untersuchen, wie sich das Ca^{2+} -Signal in ansteigenden und abfallenden Konzentrationsgradienten von Resact verhalten würde.

6 Literaturverzeichnis

- Babcock, D.F., Bosma, M.M., Battaglia, D.E., Darszon, A. (1992). Early persistent activation of sperm K^+ channels by the egg peptide Speract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 6001-6005.
- Beltran, C., Darszon, A., Labarca, P. (1994). A high-conductance voltage-dependent multistate Ca^{2+} channel found in sea urchin and mouse spermatozoa. *FEBS Lett.* 338, 23-26.
- Beltran, C., Zapata, O., Darszon, A. (1996). Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase. *Biochemistry.* 11; 35(23), 7591-7598.
- Bentley, J.K., Shimomura, H., Garbers, D.L. (1986). Retention of a functional resact receptor in isolated sperm plasma membranes. *Cell.* 25;45(2), 281-288.
- Boekhoff, I., Tareilus, E., Breer, H. (1990). Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J.* 9(8):2453-2458.
- Bookbinder, L.H., Moy, G.W. Vacquier, V.D. (1991). In vitro phosphorylation of sea urchin sperm adenylate cyclase by cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Mol Reprod Dev.* 28(2):150-157.
- Bracho, G.E., Fritch, J.J., Tash, J.S. (1997). A Method for Preparation, Storage, and Activation of Large Populations of Immobile Sea Urchin Sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 59-62.
- Breer, H., Boekhoff, I., Tareilus, E., (1990). Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* 3;345 (6270):65-68
- Campbell, D.L., Qu, Y., Rasmusson, R.L., Strauss, H.C., (1993). The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. II. Closed state reverse use-dependent block by 4-aminopyridine. *J. Gen. Physiol.* 101(4): 603-626.
- Castle, N.A., Slawsky, M.T. (1993). Characterisation of 4-aminopyridine block of the transient outward K^+ current in adult rat ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264(3): 1450-1459.
- Cohen-Dayag, A., Ralt, D., Tur-Kaspa, I., Manor, M., Makler, A., Dor, J., Mashiach, S., Eisenbach, M., (1994). Sequential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50: 786-790.

- Cohen-Dayag, A., Ralt, D., Tur-Kaspa, I., Manor, M., Makler, A., Dor, J., Mashiach, S., Eisenbach, M., (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11039-11043.
- Cook, S.P., Babcock, D.F. (1993a). Selective modulation by cGMP of the K⁺ channel activated by speract. *J. Biol. Chem.* 268, 22402-22407.
- Cook, S.P., Babcock, D.F. (1993b). Activation of Ca²⁺ permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by Speract. *J. Biol. Chem.* 268: 22408-22413.
- Cook, S.P., Brokaw, C.J., Muller, C.H., Babcock, D.F. (1994). Sperm chemotaxis: Egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev. Biol.* 165: 10-19.
- Cosson, M.P. (1990). Sperm chemotaxis. Controls of sperm motility: biological and clinical aspects. CRC Press, Boca Raton, FL: 103-135.
- Dangott, L.J., Garbers, D.L. (1984). Identification and partial characterisation of the receptor for speract. *J. Biol. Chem.* 259: 13712-13716.
- Darszon, A., Beltran, C., Felix, R., Nishigaki, T., Trevino, C.L. (2001). Ion transport in sperm signaling. *Dev. Biol.* 240(1): 1-14.
- Dzeja, C., Hagen, V., Kaupp, U.B., Frings, S. (1999). Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* 18: 131-144.
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M., Kaupp, U.B. (1995). Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15: 169-179.
- Gauss, R., Seifert, R., Kaupp, U.B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarisation-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-587.
- Galindo, E. G., Beltran, C., Cargoe, E. J. Jr., Darszon, A. (2000). Participation of a K⁺ Channel modulated directly by cGMP in the Speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 221: 285-294.
- Garbers, D.L. (1981). The elevation of cyclic AMP concentrations in flagella-less sea urchin sperm heads. *J. Biol. Chem.* 256(2), 620-624.
- Garbers, D.L., Watkins, H.D., Hansbrough, J.R., Smith, A., and Misono, K.S. (1982). The amino acid sequence and chemical synthesis of speract and of speract analogues. *J. Biol. Chem.* 257, 2734-2737.
- Garbers, D.L. (1989). Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 719-742.

Gauss, R., Seifert, R., Kaupp, U.B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*. 11: 393(6685): 583-587.

Gibson, Q.H. (1969). Rapid Mixing: Stopped Flow. *Meth. Enzymol.* 16: 187-229.

Giojalas, L.C., Rovasio, R.A. (1998). Mouse spermatozoa modify their dynamic parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *Int. J. Androl.* 21: 201-206.

Godde, M., Dissertation, Universität Regensburg (1996). Elektrophysiologische Charakterisierung von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen sowie biophysikalische Untersuchungen zur Signaltransduktion in Spermien. ISSN 0944-2952.

Gomez, M.P., Nasi, E. (1994). Blockage of the light-sensitive conductance in hyperpolarizing photoreceptors of the scallop. Effects of tetraethylammonium and 4-aminopyridine. *J. Gen. Physiol.* 104, 487-505.

Gorczyca, W., Van Hooser, P., Palczewski, K. (1994). Nucleotide inhibitors and activators of retinal guanylyl cyclase. *Biochemistry* 33, 3217-3222.

Gray-Keller, M., Denk, W., Shraiman, B. & Detwiler, P.B. (1999). Longitudinal spread of second messenger signals in isolated rod outer segments of lizards. *J. Physiol.* 519, 679-692.

Gutfreund, H., (1969). Rapid mixing: Continuous Flow. *Meth. Enzymol.* 16: 229-249.

Hagen, V., Bendig, J., Frings, S., Eckardt, T., Helm, S., Reuter, D., Kaupp, U.B. (2001). Highly Efficient Ultrafast Phototriggers for cAMP and cGMP by using Long-Wavelength UV/Vis-Activation. *Angew. Chem.* 40, 1045-1048.

Hagen, V., Frings, S., Bendig, J., Lorenz, D., Wiesner, B., Kaupp, U.B. (2002). Fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung der Freisetzung von zyklischen Nucleotiden aus photoaktivierbaren [Bis(carboxymethoxy)-cumarin-4-yl]methylestern in Zellen. *Angew. Chem.* 114, 3775-3777.

Hansbrough, J.R., Garbers, D.L. (1981a). Speract: Purification and characterisation of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 256: 1447-1452.

Hansbrough, J.R. & Garbers, D.L. (1981b). Sodium-dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin. *J. Biol. Chem.* 256, 2235-2241.

Haugland, R.P. (1996). Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes.

Harper, M.J.K. (1994). Gamete and zygote transport. The physiology of reproduction Vol. 1, Raven Press Ltd., New York: 123-187.

Harvey, E.B. (1956). The american Arbacia and other sea urchins. Princeton University Press.

Johnson, K.A. (1986). Rapid kinetic analysis of mechanochemical adenosinetriphosphatases. *Meth. Enzymol.* 134: 677-705.

Kao, J.P.Y. (1994). Practical aspects of measuring $[Ca^{2+}]$ with fluorescent indicators. In: A practical guide to the study of calcium in living cells. (NUCCITELLI, R., ed.), *Methods Cell Biol.* 40: 155-181.

Kaupp, U.B., Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* 63:235-257.

Kaupp, U.B., Seifert, R. (2002). Cyclic Nucleotide-Gate Channels. *Physiol. Rev.* 82, 769-824.

Kaupp, U.B., Koch, K.W. (1992). Role of cGMP and Ca^{2+} in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 153-175.

Kopf, G.S., Lewis, C.A., and Vacquier, V.D. (1983). Methylxanthines stimulate calcium transport and inhibit cyclic nucleotide phosphodiesterases in abalone sperm. *Develop. Biol.* 99, 115-120.

Kopf, G.S., Lewis, C.A., and Vacquier, V.D. (1984). Characterization of basal and methylxanthine-stimulated Ca^{2+} transport in abalone spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 259, 5514-5520.

Kopf, G.S. and Vacquier, V.D. (1984). Characterization of a calmodulin-stimulated adenylate cyclase from abalone spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 259, 7590-7596.

Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltran, C., Lievano, A., Darszon, A. (1996). A cAMP regulated K^{+} -selective channel from sea urchin sperm plasma membrane. *Dev. Biol.* 174: 271-280.

Lamb, T.D., McNaughton, P.A. & Yau, K.-W. (1981). Spatial spread of activation and background desensitization in toad rod outer segments. *J. Physiol.* 319, 463-496.

Lee, H.C., Johnson, C., Epel, D. (1983). Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev. Biol.* 95: 31-45.

Lee, H.C. & Garbers, D.L. (1986). Modulation of the voltage-sensitive Na^{+}/H^{+} exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *J. Biol. Chem.* 261, 16026-16032.

Lievano, A., Vega Saenz De Miera, E. C., Darszon, A. (1990). Ca^{2+} channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* 95: 273-295.

- Lillie, F.R. (1913). Studies of fertilisation. V. The behavior of the spermatozoa of *Nereis* and *Arbacia* with special reference to egg extractives. J. Exp. Zool. 14: 515-574.
- Lincoln T.M., Cornwell, T.L. (1993). Intracellular cyclic GMP receptor proteins. FASEB J. 1;7(2):328-338.
- Matsui, T., Nishiyama, I., Hino, A., and Hoshi, M. (1986). Develop.Growth & Differ. 28, 339-348.
- Matsumoto, M., Briones, A.V., Nishigaki, T., and Hoshi, M. (1999). Sequence analysis of cDNAs encoding precursors of starfish asterosaps. Develop. Genet. 25, 130-136.
- Miller, R.L. and Vogt, R. (1996). An N-terminal partial sequence of the 13 kDa Pycnopodia helianthoides sperm chemoattractant 'startrak' possesses sperm-attracting activity. J. Exp. Biol. 199, 311-318.
- Nishigaki, T., Chiba, K., Miki, W., and Hoshi, M. (1996). Structure and function of asterosaps, sperm-activating peptides from the jelly coat of starfish eggs. Zygote 4, 237-245.
- Nishigaki, T., Chiba, K., and Hoshi, M. (2000). A 130-kDa membrane protein of sperm flagella is the receptor for asterosaps, sperm-activating peptides of starfish *Asterias amurensis*. Develop. Biol. 219, 154-162.
- Nishigaki, T., Darszon, A. (2000). Real-time measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor. Dev. Biol. 223: 17-26.
- Nishigaki, T., Zamudio, F.Z., Possani, L.D., Darszon, A. (2001). Time-resolved sperm responses to an egg peptide measured by stopped-flow fluorometry. Biochem. Biophys. Res. Commun. 284: 531-535.
- Oliveira, R.G., Tomasi, L., Rovasio, R.A., Giojalas, L.C. (1999). Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. J. Reprod. Fertil. 115: 23-27.
- Olson, J.H., Xiang, X., Ziegert, T., Kittelson, A., Rawls, A., Bieber, A.L., Chandler, D.E. (2001). Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. Proc Natl Acad Sci. 25; 98 (20):11205-11210.
- Palmer, L. (1937). The shedding reaction in *Arbacia punctulata*. Physiol. Zool. 10: 352-367.
- Picones, A., Korenbrot, J.I. (1995). Permeability and interaction of Ca^{2+} with cGMP-gated ion channels differ in retinal rod and cone photoreceptors. Biophys. J. 69: 120-127.

Pugh, E.N.Jr. & Lamb, T.D. in Handbook of Biological Physics (eds Stavenga, D.G., DeGrip, W.J. & Pugh, E.N.Jr.) 183-255 (Elsevier Science B.V., North-Holland, 2000).

Quill, T.A., Ren, D., Clapham, D. & Garbers, D.L. (2001). A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12527-12531.

Ralt, D., Goldenberg, M., Fetterolf, P., Thompson, D., Dor, J., Mashiach, S., Garbers, D.L., Eisenbach, M. (1991). Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2840-2844.

Ralt, D., Manor, M., Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Ben-Shlomo, I., Makler, A., Yuli, I., Dor, J., Blumberg, S., Mashiach, S., Eisenbach, M., (1994). Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol. Reprod.* 50: 774-785.

Ramarao, C.S., Garbers, D.L. (1985). Receptor-mediated regulation of guanylate cyclase activity in spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 260(14): 8390-8396.

Ren, D., Navarro, B., Perez, G., et al. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603-609.

Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C. Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., Clapham, D.E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 413 (6856):603-609.

Repaske, D.R., Garbers, D.L. (1983). A hydrogen ion flux mediates stimulation of respiratory activity by Speract in sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 258: 6025-6029.

Reynaud, E., De La Torre, D.L., Zapata, O., Lievano, A., Darszon, A. (1993). Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS Lett.* 329: 210-214.

Sano, M. (1976). Subcellular localisations of guanylate cyclases and 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in sea urchin sperm. *Biochem. Biophys. Acta* 428:525-531.

Schackmann, R.W., Christen, R., Shapiro, B.M. (1984). Measurement of plasma membrane and mitochondrial potentials in sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* 259: 13914-13922.

Schackmann, R.W., Chock, P.B. (1986). Alteration of intracellular $[Ca^{2+}]$ in sea urchin sperm by the peptide Speract. *J. Biol. Chem.* 261: 8719-8728.

Schoenmakers, T.J., Visser, G.J., Flik, G., Theuvsen, A.P. (1992). Chelator: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Bio Techniques* 12, 870-878.

Seifert, R., Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P., Kaupp, U.B. (1999). Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3; 96(16): 9391-9396.

Silver, R.B., Cole, R.D., Cande, W.Z. (1980). Isolation of mitotic apparatus containing vesicles with calcium sequestration activity. *Cell* 19: 505-516.

Shimizu, T., Kinoh, H., Yamaguchi, M., and Suzuki, N. (1990). *Develop. Growth Differ.* 32, 473-487.

Shimomura, H., Garbers, D.L. (1986a). Differential effects of resact analogues on sperm respiration rates and cyclic nucleotide concentration. *Biochemistry* 25: 3405-3410.

Shimomura, H.L., Dangott, L.J., Garbers, D.L (1986b). Covalent coupling of a resact analogue to guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 261: 15778-15782.

Shirakawa, H., Miyazaki, S. (1999). Spatiotemporal characterisation of intracellular Ca^{2+} rise during the acrosome reaction of mammalian spermatozoa induced by zona pellucida. *Dev. Biol.* 208: 70-78.

Solzin, J. Diplom-Arbeit, Universität zu Köln (1999). Kinetische Messungen von Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration in Spermien.

Suzuki, N., Nomura, K., Ohtake, H., Isaka, S. (1981). Purification and the primary structure of sperm-activating peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99: 1238-1244.

Suzuki, N., Shimomura, H., Radany, E.W., Ramarao, C.S., Ward, G.E., Bentley J.K., Garbers, D.L. (1984). A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 259, 14874-14879.

Suzuki, N. (1995). Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glucoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zool. Sci.* 12, 13-27.

Suzuki, N., Yoshino, K., Kurita, M., Nomura, K., and Yamaguchi, M. (1988). A novel group of sperm activating peptides from the sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 90(2), 305-311.

Tasken, K., Skälhegg, B.S., Tasken, K.A., et al. (1997). Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 31; 191-204.

Tarelius, E., Boeckhoff, I., Spielman, A.I., Breer, H. (1995). Approaches for monitoring rapid kinetics of second messenger signaling. In: Experimental Cell Biology of Taste and Olfaction. SPIELMAM, A.I. & BRAND, J.G. (eds.), New York: 193-202.

Tretter, L., Chinopoulos, C., Adam-Vizi, V. (1998). Plasma membrane depolarisation and disturbed Na^+ homeostasis induced by the protonophore carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazon in isolated nerv terminals. Mol. Pharmacol. 53(4): 734-741.

Villanueva-Diaz, C., Vadillo-Ortega, F., Kably-Ambe, A. (1990). Evidence that the human follicular fluid contains chemoattractant for spermatozoa. Fert. Steril. 54: 1180-1182.

Ward, G.E., Brokaw, C.J., Garbers, D.L., Vacquier, V.D. (1985a). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptid from the egg jelly layer. J. Biol. Chem. 101: 2324-2329.

Ward, G.E., Garbers, D.L., and Vacquier, V.D. (1985b). Effects of extracellular egg factors on sperm guanylate cyclase. Science 227, 768-770.

Yamaguchi, M., Niwa, T., Kurita, M., and Suzuki, N. (1988). Develop. Growth & Differ. 30, 159-167.

Yoshino, K., Takao, T., Shimonishi, Y., and Suzuki, N. (1991). Determination of the amino acid sequence of an intramolecular disulfide linkage-containing sperm-activating peptide by tandem mass spectrometry. FEBS Lett. 294, 179-182.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI) des Forschungszentrums Jülich und am Marine Biological Laboratory (MBL) in Woods Hole (MA, USA) angefertigt. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

- Herrn Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas, sein persönliches Engagement während der Durchführung dieser Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft,
- Herrn Prof. Dr. E. Hildebrand und Herrn Prof. Dr. J.E. Brown für ihre stetige Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Beratungen,
- Herrn R. Esser, Herrn D. Grammig und Herrn A. Becker-Thomer für ihre vielseitige Hilfe,
- Herrn D. Portz für seine technische Hilfe bei der Optimierung der Stopped-Flow-Apparatur,

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. I. Weyand, der mit seiner steten Diskussionsbereitschaft wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4030
Februar 2003
ISSN 0944-2952