



Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1

***Untersuchungen zur Bedeutung der
intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für die
Chemotaxis von Seeigel- und Seestern-Spermien***

Qui Van

***Untersuchungen zur Bedeutung der
intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für die
Chemotaxis von Seeigel- und Seestern-Spermien***

Qui Van

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4190

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1 Jül-4190

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2005)

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

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe simultan das Schwimmverhalten und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von schwimmenden Spermien des Seeigels *A. punctulata* und des Seesterns *A. amurensis* beobachtet und analysiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die extrazelluläre Stimulation von *A. punctulata* Spermien mit dem Lockstoff Resact als auch die intrazelluläre Freisetzung von cGMP eine Folge von Ca^{2+} -Spikes im Flagellum auslösen. Ein Ca^{2+} -Spike löst eine kombinierte Verhaltensantwort aus. Diese Verhaltensantwort besteht aus einer Biegung in der Schwimmtrajektorie gefolgt von einem Abschnitt geraden Schwimmens („turn and run“). Die Beobachtung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von schwimmenden Spermien in einem definierten Lockstoff-Gradienten zeigte, dass die induzierten Ca^{2+} -Spikes und die Stimulus-Funktion synchronisiert sind. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die zeitliche Abfolge von Ca^{2+} -Spikes das Schwimmverhalten steuert. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde ein Modell zur Chemotaxis von Spermien erstellt, das erläutert wie Spermien sich in einem Gradienten orientieren.

Das Eizellpeptid des Seesterns *A. amurensis* Asterosap wurde als Lockstoff identifiziert. Der Vergleich der Chemotaxis zwischen Spermien des Seeigels *A. punctulata* und des Seesterns *A. amurensis* zeigte, dass das chemotaktische Verhalten beider Spezies in Bezug auf 1. die cGMP-induzierte Ca^{2+} -Dynamik im Flagellum, 2. die durch Ca^{2+} ausgelöste Verhaltensantwort und 3. das Schwimmverhalten in einem Lockstoff-Gradienten vergleichbar ist. Die Schlussfolgerung aus diesem Vergleich ist, dass cAMP weder bei der Chemotaxis von Spermien des Seesterns noch von Spermien des Seeigels eine essentielle Rolle spielt. Der cGMP-vermittelte chemotaktische Signalweg ist demnach in zwei Spezies konserviert geblieben, die vor ca. 500 Millionen Jahren divergierten.

Ein cGMP-aktivierter Ionenkanal, der für eine Hyperpolarisation oder für einen Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich sein könnte, konnte in *A. punctulata* bisher nicht identifiziert werden. Womöglich spielen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, die bisher nur mit der akrosomalen Exozytose in Verbindung gebracht wurden, doch eine bedeutsame Rolle für den Ca^{2+} -Einstrom in der Chemotaxis von Spermien.

Abstract

The events that occur during chemotaxis of sperm are only partly known. As an essential step toward determining the underlying mechanism, we developed a sensitive laser-stroboscopic technique that allows the recording of changes in intracellular Ca^{2+} -concentration in swimming sperm of the sea urchin *Arbacia punctulata* and starfish *Asterias amurensis*. Stimulation of the sea urchin *Arbacia punctulata* by the chemoattractant or by intracellular cGMP evokes Ca^{2+} spikes in the flagellum. These Ca^{2+} spikes control the swimming behaviour of sperm. A Ca^{2+} spike elicits a turn in the trajectory followed by a period of straight swimming ('turn-and-run').

The train of Ca^{2+} spikes gives rise to repetitive loop-like movements. When sperm swim in a concentration gradient of the attractant, the Ca^{2+} spikes and the stimulus function are synchronized, suggesting that precise timing of Ca^{2+} spikes controls navigation. We identified the peptide asterosap as a chemotactic factor of the starfish *Asterias amurensis*. The similarities in first, the cGMP-induced Ca^{2+} spikes in the flagellum, second, the motor response and third the swimming behavior of sperm from starfish and sea urchin imply that the signaling pathway of chemotaxis has been conserved in species, which diverged almost 500 million years ago.

A cGMP-gated ion channel (CNG-channel), which might be involved in hyperpolarisation or Ca^{2+} entry, could not yet be identified in *Arbacia punctulata*. Voltage-sensitive Ca^{2+} -channels, which are only said to have a function in the acrosome reaction, however, seem to play a more important role for the Ca^{2+} entry during sperm chemotaxis.

I Inhalt

I	Inhalt.....	I
II	Abkürzungen.....	V
1	Einleitung.....	1
1.1	Stadien der Eizellbefruchtung.....	1
1.2	Chemotaxis.....	2
1.2.1	Chemotaxis von Bakterien.....	2
1.2.2	Chemotaxis von Spermien mariner Invertebraten	5
1.4	Zielsetzung	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Material und Lösungen	13
2.1.1	Käfigverbindungen (<i>caged compounds</i>)	14
2.1.1.1	<i>Caged</i> -zyklische Nukleotide	14
2.1.1.2	<i>Caged</i> Resact.....	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Haltung der Seeigel.....	18
2.2.2	Entnahme der Spermien.....	18
2.2.3	Vitalitätsbestimmung der Spermien.....	19
2.2.4	Analyse des Schwimmverhaltens unter dem Dunkelfeld-Mikroskop	19
2.2.5	Beobachtung der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in einzelnen Spermien unter dem Fluoreszenz-Mikroskop	22
2.2.6	Aufnahme und Analyse der Schwimmtrajektorien.....	26
2.2.7	Stimulus-Funktion und Korrelations-Analyse.....	26
2.3	Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1	<i>E.coli</i> -Zellkultur.....	27
2.3.1.1	Verwendeter Bakterienstamm und Plasmidvektoren	27
2.3.1.2	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für <i>E.coli</i>	28
2.3.1.3	Anzucht von <i>E.coli</i> -Bakterienkulturen.....	29
2.3.2	Plasmid-DNA-Präparationen	30
2.3.2.1	Mini-Präparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979).....	30
2.3.2.2	Alkalische Maxi- und Mega-Präparationen	31
2.3.3	Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren.....	32
2.3.3.1	Phenol/Chloroformextraktion.....	32

2.3.3.2	Ethanol-Präzipitation.....	32
2.3.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	32
2.3.4.1	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	32
2.3.4.2	Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen.....	33
2.3.5	Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen.....	33
2.3.5.1	DNA-Größen- und Mengenstandard.....	33
2.3.6	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	34
2.3.6.1	Elution von DNA aus Agarosegelen nach der Zentrifugationsmethode	34
2.3.7	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	34
2.3.8	Modifizierung von DNA-Fragmenten	35
2.3.8.1	Glätten überhängender Einzelstrang-Enden.....	35
2.3.8.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten.....	35
2.3.8.3	Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren.....	35
2.3.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	36
2.3.9.1	Ligation	36
2.3.9.2	Transformation	36
2.3.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
2.3.10.1	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden.....	37
2.3.10.2	Bedingungen für die PCR-Reaktionen.....	37
2.3.10.3	Reinigung der PCR-Produkte.....	38
2.3.11	DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer.....	38
2.3.11.1	Sequenzierreaktion	38
2.3.11.2	PCR zur Sequenzierung	38
2.3.11.3	Denaturierende Polyacrylamid-Sequenziergele	39
2.3.12	Herstellung einer cDNA-Bibliothek.....	39
2.3.12.1	Titerbestimmung einer cDNA-Bibliothek.....	41
2.3.12.2	Amplifizierung einer cDNA-Bibliothek.....	41
2.3.12.3	Ausplattieren von λ -Phagen	41
2.3.12.4	Isolierung von λ -Phagen	42
2.3.13	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren.....	42
2.3.13.1	Radioaktive Markierung spezifischer Sonden.....	42
2.3.13.2	Transfer und Immobilisierung von λ -Phagen DNA.....	43

2.3.13.3	Hybridisierung von immobilisierter λ -Phagen DNA mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden.....	43
2.3.13.4	Transfer und Immobilisierung von DNA auf Nylonmembran (<i>Southern Blot</i>).....	44
2.3.13.5	Hybridisierung von immobilisierter DNA mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden.....	44
2.3.14.	Präparation gesamtgenomischer DNA aus <i>dry sperm</i>	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Untersuchungen des Schwimmverhaltens von Spermien im Dunkelfeldmikroskop.....	48
3.1.1	Schwimmverhalten von Spermien des Seeigels <i>A. punctulata</i> und des Seesterns <i>A. amurensis</i>	48
3.1.2	Schwimmverhalten von <i>A. punctulata</i> Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP	48
3.1.3	Schwimmverhalten von <i>A. punctulata</i> Spermien in einem Resact-Gradienten.....	53
3.1.4	Schwimmverhalten von <i>A. amurensis</i> Spermien nach Stimulation mit Asterosap.....	57
3.1.5	Schwimmverhalten von <i>A. amurensis</i> Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP	59
3.2	Beobachtung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in schwimmenden Spermien	62
3.2.1	Ca^{2+} -Dynamik in <i>A. punctulata</i> Spermien nach Freisetzung von cGMP	62
3.2.2	Stimulus-Funktion und Ca^{2+} -Dynamik in schwimmenden <i>A. punctulata</i> Spermien in einem definierten Resact-Gradienten.....	68
3.2.2	Ca^{2+} -Dynamik in schwimmenden <i>A. amurensis</i> Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP	73
3.3	Molekularbiologische Untersuchungen zur Klonierung eines Gens, das für einen zyklisch-nukleotid gesteuerten Ionkanal (CNG-Kanal) kodiert	79
3.3.1	Amplifikation von cDNA Fragmenten mit der Polymerase-Kettenreaktion	79
3.3.2	Durchmustern und Isolierung von cDNA-Klonen aus einer <i>A. punctulata</i> -cDNA-Bibliothek.....	80
3.3.3	<i>Southern Blot</i> Analyse genomischer <i>A. punctulata</i> DNA.....	83
4	Diskussion.....	85
4.1	Ca^{2+} -Spikes bestimmen das chemotaktische Schwimmverhalten von Spermien	85
4.2	Ca^{2+} -Dynamik und Schwimmverhalten im Gradienten	92

4.3 Zusammenhang zwischen der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Verhaltensantwort	96
4.4 Evolutionäre Konservierung des chemotaktischen Signalweges in <i>A. punctulata</i> und <i>A. amurensis</i> Spermien	97
4.4.1 Identifizierung von Asterosap als chemotaktisch-aktives Peptid	97
4.4.2 Vergleich der Chemotaxis zwischen <i>A. punctulata</i> und <i>A. amurensis</i> Spermien	97
4.5 Identifizierung eines cGMP-aktivierten Ionenkanals in Seeigelspermien	99
4.4 Ausblick	100
5 Zusammenfassung	101
6 Literatur	103
7 Anhang	111
7.1 Sequenz des zusammengesetzten CNG-Kanals aus <i>S. purpuratus</i>	111
7.2 Weitere in dieser Arbeit verwendete Primer	112

II Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
<i>A. amurensis</i>	<i>Asterias amurensis</i>
<i>A. punctulata</i>	<i>Arbacia punctulata</i>
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
cDNA	revers transkribierte DNA (<i>c</i> omplementary <i>DNA</i>)
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
CHD	Zyklase-Homologie-Domäne (<i>cyclase-homology-domain</i>)
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CNG-Kanäle	zyklisch-Nukleotid gesteuerte Ionenkanäle (<i>cyclic nucleotide gated channel</i>)
cpm	Zählereignisse pro Minute (<i>c</i> ounts <i>p</i> er <i>m</i> inute)
C-terminus	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	Extra-Zelluläre-Domäne (<i>extra-cellular-domain</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoldiamintetraacetat
g	Gramm, bzw. Normal-Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
GC	Guanylyl-Zyklase (<i>guanylyl cyclase</i>)
h	Stunde
HCN-Kanäle	Hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch-Nukleotid gesteuerter Ionenkanäle (<i>hyperpolarisation activated and cyclic nucleotide gated channel</i>)
HEPES	10 N-2-hydroxyl-piperazine-N'-3-propane sulphonic acid
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galaktosid
J/cm ²	Joule pro Quadratzentimeter
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KHD	<u>K</u> inase- <u>H</u> omologie- <u>D</u> omäne
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette

OD	Extinktion bei der im Index angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pM	Picomolar
Pos.	Position
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. purpuratus</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.	Seite
s	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Hybridsierungstemperatur von Primern bei der PCR
TM	Transmembraner Bereich
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
ü.N	über Nacht
ÜK	über Nacht-Kultur
V	Volt
v/v	Volumenprozent
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch die Anfangsbuchstaben der Basen bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin). Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt:

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1 Einleitung

In höheren eukaryotischen Lebewesen ist die geschlechtliche Fortpflanzung eine Voraussetzung für die Arterhaltung. Dabei ist der entscheidende Schritt zur Entstehung eines neuen Organismus die Vereinigung von Spermium und Eizelle.

1.1 Stadien der Eizellbefruchtung

Eine Reihe verschiedener Wechselwirkungen zwischen Spermium und Eizelle gewährleistet eine erfolgreiche Eibefruchtung.

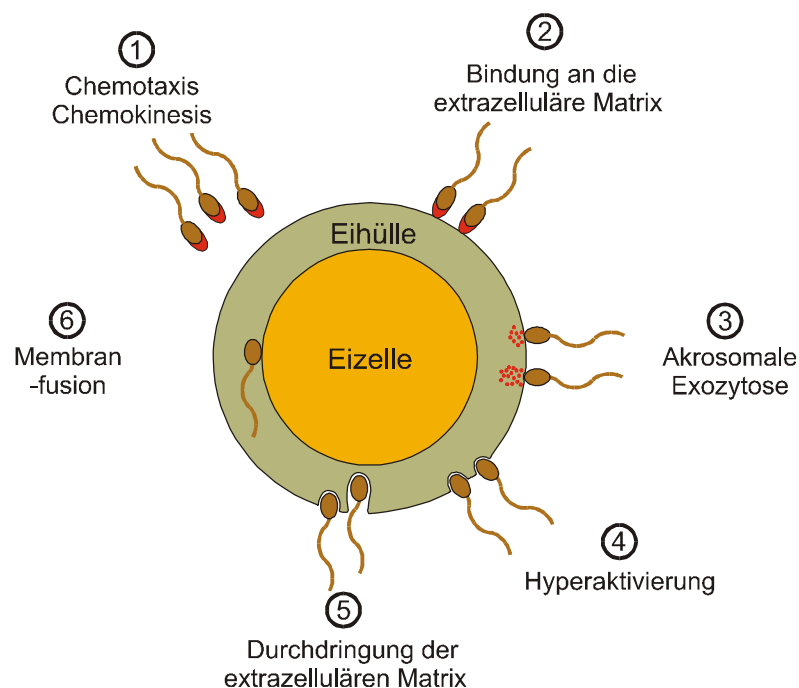


Abbildung 1.1: Stadien der Eizellbefruchtung. Dargestellt sind die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen Spermium und Eizelle (Erläuterung im Text).

Spermien sind hochspezialisierte bewegliche Zellen, die auf Faktoren, die von der Eizelle freigesetzt werden, reagieren (Ward & Kopf, 1993; Harper, 1994). Diese Faktoren beeinflussen das Schwimmverhalten der Spermien: die Faktoren kontrollieren sowohl die Schwimgeschwindigkeit (Chemokinesis) als auch die Richtung, in die das Spermium schwimmt (Chemotaxis). Dadurch wird ein Zusammentreffen zwischen Spermium und

Eizelle ermöglicht. Chemotaxis ist für Spermien von marinen Invertebraten gut belegt (Cosson, 1990). In den vergangenen Jahren häuften sich auch die Hinweise auf chemotaktisches Verhalten bei Säugetierspermien (Villanueva-Díaz et al., 1990; Villanueva-Díaz et al., 1992; Ralt et al., 1991; Ralt et al., 1994; Cohen-Dayag et al., 1995; Navarro et al., 1998; Giojalas & Rovasio, 1998; Oliveira et al., 1999; Serrano et al., 2001; Olson et al., 2001; Fabro et al., 2002). Nachdem das Spermium die Eizelle erreicht hat, bindet es an deren extrazelluläre Glykoproteinmatrix. Die Bindung an die Ei-Matrix löst die akrosomale Exozytose aus, die große Mengen verschiedener Proteasen und hydrolytisch aktiver Enzyme freisetzt. Dadurch werden Bestandteile der Glykoproteinmatrix der Eizelle abgebaut. Der lokale Abbau der Eihülle gemeinsam mit einer gesteigerten Schlagfrequenz des Flagellums (Hyperaktivierung) ermöglichen es dem Spermium zur Plasmamembran der Eizelle vorzudringen. Im nächsten Schritt verschmelzen die Plasmamembranen von Spermium und Eizelle. Schließlich fusionieren die Zellkerne miteinander.

1.2 Chemotaxis

Unter Chemotaxis versteht man die gerichtete Bewegung einer Zelle in einem chemischen Gradienten eines Lockstoffes (*attractant*) oder eines Schreckstoffes (*repellent*), die dazu führt, dass die Zelle sich zu der Quelle des *attractants* oder von der Quelle des *repellents* weg bewegt. Chemotaxis ist für prokaryotische und eukaryotische Zellen dokumentiert (Zur Übersicht: Falke et al., 1997; Chung et al., 2001; Eisenbach et al., 2004). Ein weiteres Beispiel für die Chemotaxis eukaryotischer Zellen ist neben der Spermien-Chemotaxis die gezielte Migration von weissen Blutzellen zum Entzündungsherd. Am besten untersucht ist die Chemotaxis von Bakterien.

1.2.1 Chemotaxis von Bakterien

Bakterien bewegen sich mit Hilfe von rotierenden Geißeln (Flagellen). Die meisten Studien zur Bewegung und Chemotaxis von Bakterien wurden an *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* durchgeführt (zur Übersicht: Berg, 1975; Eisenbach, 1990; Macnab, 1996; Falke et al., 1997; Goudreau & Stock, 1998; Manson et al., 1998; Stock et al., 2000; Eisenbach et al., 2004; Wadhams & Armitage, 2004). Diese besitzen 5-10 Flagellen, die auf der Zelloberfläche verteilt sind. Ein Bakterien-Flagellum besteht aus Flagellinuntereinheiten und ist eine extrazelluläre Struktur, die durch einen molekularen Motor angetrieben wird. Dieser Motor

kann die Flagellen sowohl im Uhrzeigersinn (*clockwise*, CW) als auch im Gegenuhrzeigersinn (*counterclockwise*, CCW) drehen und unmittelbar zwischen den beiden Drehrichtungen umschalten. Daraus ergeben sich zwei Bewegungsmuster: Wenn die Flagellen sich CCW drehen, bilden sie ein gemeinsames Bündel, so dass die Bakterienzelle geradlinig vorwärts schwimmt. Drehen sich die Flagellen CW, fällt das Bündel in einzelne ausgerichtete Flagellen auseinander und die Zelle beginnt auf der Stelle zu taumeln (Macnab & Koshland, 1972; Berg & Brown, 1972) (Abb. 1.2). In Abwesenheit eines Lockstoffes taumelt eine Bakterienzelle je nach Bakterienstamm und Wachstumsphase alle 1-10 s (Staropoli & Alon, 2000). Dadurch, dass die Bakterienzelle nach jedem Taumeln wieder geradlinig schwimmt, jedoch nach jeder Taumelbewegung eine zufällige Richtungsänderung macht, führt die Bakterienzelle bei längerer Beobachtung eine ungerichtete zufällige Bewegung aus (*random walk*) (Abb. 1.2 A). Schwimmt eine Bakterienzelle in einem Lockstoff-Gradienten in Richtung Quelle, zeigt sie ein zeitlich verlängertes geradliniges Schwimmen. Bewegt sich die Bakterienzelle in entgegengesetzter Richtung, so ist das geradlinige Schwimmen zeitlich verkürzt. Das heisst, dass die Häufigkeit der Taumelbewegung beim Schwimmen in Richtung Quelle abnimmt und beim Wegschwimmen von der Quelle zunimmt. Die Taumelbewegung dient dazu, den Weg einer fehlgeleiteten Bakterienzelle durch zufällige Richtungsänderung zu korrigieren. Die Regulation der Taumelhäufigkeit steht daher im Mittelpunkt der Bakterien-Chemotaxis. Weil Bakterien sich der Lockstoffquelle durch Zufallsbewegungen mit einer Vorzugsrichtung nähern, wird die Chemotaxis von Bakterien als „geneigte zufällige Bewegung“ (*biased random walk*) bezeichnet (Abb. 1.2 B).

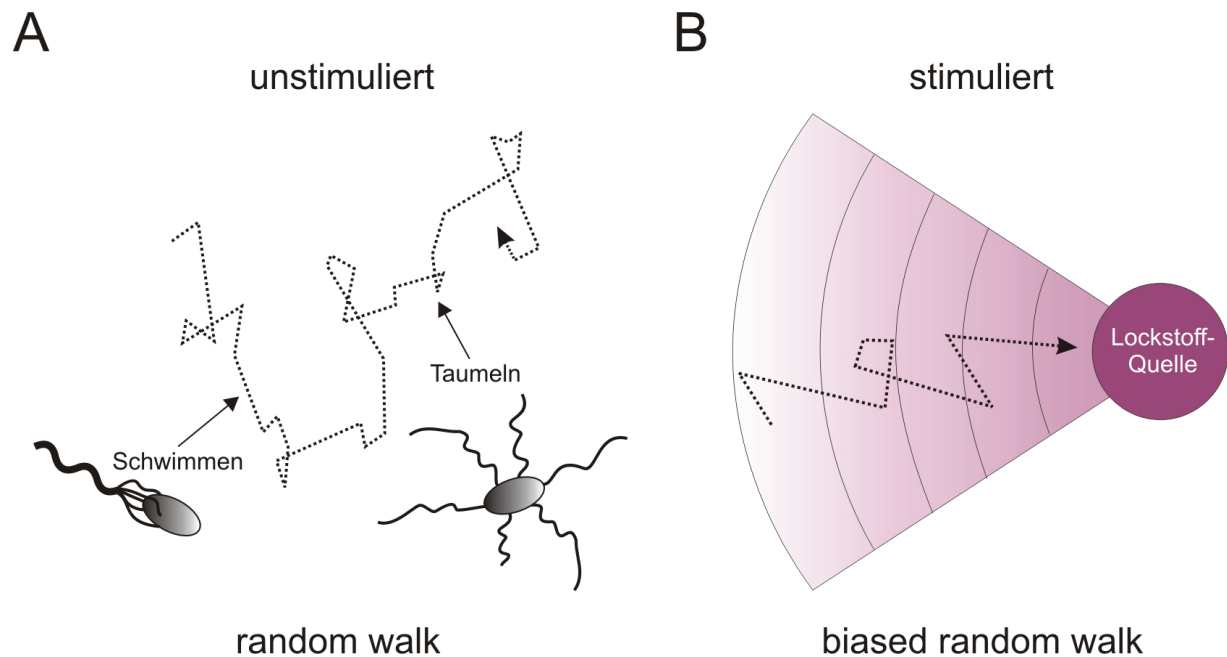


Abbildung 1.2: Schwimmverhalten von Bakterien. (A) Unter unstimulierten Bedingungen zeigen Bakterien ein ungerichtetes zufälliges Bewegungsmuster (*random walk*). (B) In einem Lockstoff-Gradienten gelangen Bakterien durch einen *biased random walk* zur Quelle (nähere Erläuterung im Text). (Abbildung entnommen und modifiziert aus Eisenbach et al., 2004)

In Bakterien binden verschiedene Lockstoffe an membranständige Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden als MCP's (Methylakzeptor-Chemotaxis-Proteine) bezeichnet (zur Übersicht: Adler, 1978; Mowbray & Sandgren, 1998). Die MCP-Rezeptoren liegen als Dimere vor (Milligan & Koshland, 1988; Levit et al., 1998) und bilden mit weiteren regulatorischen Proteinen einen supramolekularen Rezeptorkomplex (Gegner et al., 1992; Schuster et al., 1993; Shimizu et al., 2000; Gestwicki & Kiessling, 2002). Die Richtung der Flagellendrehung und damit die Taumelhäufigkeit wird durch eine Phosphorylierungskaskade in einem *Zwei-Komponenten System* gesteuert (Parkinson & Kofoid, 1992; Blair, 1995; Falke et al., 1997; Djordjevic & Stock, 1998; Goudreau & Stock, 1998; Manson et al., 1998; Eisenbach et al., 2004; Wadhams & Armitage, 2004) (Abb. 1.3). Dieses *Zwei-Komponenten System* besteht aus zwei Kinasen: 1. CheA, einer Histidin-Kinase und 2. CheY, einer Aspartat-Kinase. CheA bindet zusammen mit einem weiteren Protein (CheW) an einen freien dimeren MCP-Rezeptor-Komplex. Durch die Bindung wird CheA aktiviert und phosphoryliert sich daraufhin selbst an einem Histidinrest (1. Autophosphorylierung). Diese an CheA gehängte Phosphorylgruppe wird dann von CheY auf eine eigene Aspartatgruppe übertragen (2. Autophosphorylierung). Phosphoryliertes CheY koppelt an Proteine des Flagellenmotors und bewirkt eine CW-Rotation der Flagellen. Dies führt zum

Auseinanderfallen des Flagellenbündels und damit zu einer Taumelbewegung der Bakterienzelle. Wenn der membranständige Rezeptor-Komplex einen Lockstoff gebunden hat, bindet kein CheA. In diesem Fall wird CheA nicht aktiviert und nicht autophosphoryliert. Demnach bleibt auch CheY dephosphoryliert. Im nicht-phosphorylierten Zustand interagiert CheY nicht mit dem Flagellenmotor und die Flagellen rotieren CCW, d.h. die Flagellen bilden ein gemeinsames Bündel und die Bakterienzelle schwimmt geradeaus.

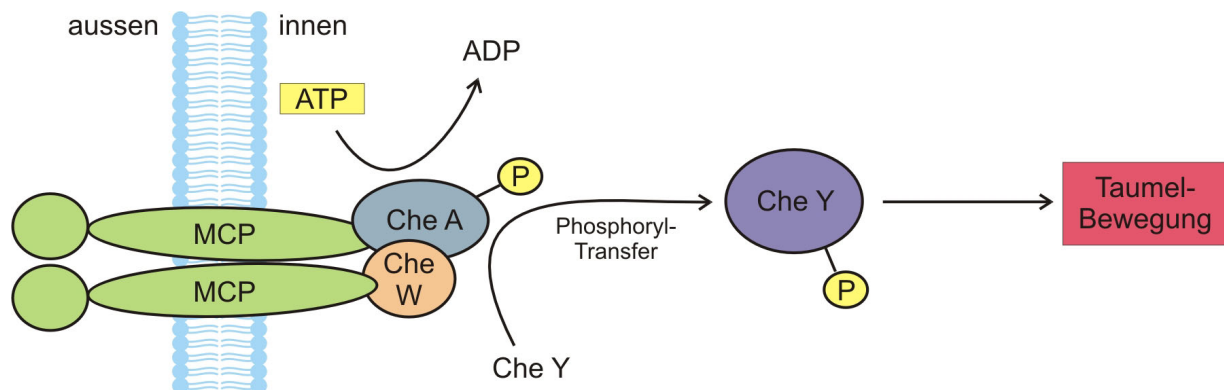


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Zwei-Komponenten Systems der Bakterien-Chemotaxis. Die Bindung von CheA und CheW an einen freien MCP-Rezeptor stimuliert die Autophosphorylierung von CheA. Die Phosphorylgruppe wird dann von CheA auf CheY übertragen. Phosphoryliertes CheY bindet an Proteine des Flagellenmotors und löst eine Taumelbewegung aus. (Abbildung entnommen und modifiziert aus Stryer, 1996)

1.2.2 Chemotaxis von Spermien mariner Invertebraten

Spermien bewegen sich mit Hilfe eines Flagellums. Anders als bei Bakterien besteht dieses Flagellum nicht aus Flagellinuntereinheiten und die Fortbewegung der Zelle erfolgt nicht durch Rotation, sondern durch Schlagen des Flagellums. Das Spermien-Flagellum besteht aus dem Axonem mit der für Eukaryoten typischen „9+2“-Mikrotubuli Dubletten-Struktur (zur Übersicht: Inaba, 2003). Das Schlagen des Flagellums wird durch ATP-getriebene Motorproteine (Dyneine) bewirkt. Die Dyneine sind mit den Mikrotubuli-Dubletten des Axonems assoziiert. Durch Hydrolyse von ATP ändert das Dynein seine Konformation und verschiebt so benachbarte Mikrotubuli-Dubletten gegeneinander. Durch Querverbindungen, die die Mikrotubuli-Dubletten lateral zusammenhalten, wird die Gleitbewegung der Dubletten in eine lokale Biegung umgewandelt. Dadurch entsteht der Flagellenschlag. Die genauen Mechanismen der Steuerung des Flagellenschlags und das daraus resultierende Bewegungsmuster der Spermien sind noch nicht in allen Details bekannt. Wie im Falle der bakteriellen Chemotaxis beginnt auch die Chemotaxis von Spermien mit der Bindung von

Lockstoffen an membranständige Rezeptoren. Die Signalverarbeitung erfolgt bei Invertebraten-Spermien jedoch nicht - wie in Bakterien – durch einen Phosphoryltransfer sondern durch sekundäre Botenstoffe (zyklische Nukleotide und Ca^{2+}).

Die molekularen Mechanismen der Signaltransduktionskette, die das Schwimmverhalten von Säugetier-Spermien steuern, sind bisher wenig bekannt. Im Gegensatz dazu sind die molekularen Mechanismen der Chemotaxis von Seeigel-Spermien relativ gut untersucht. Seeigel sind marine Invertebraten, die in Kolonien am Meeresboden leben. Sie entlassen reife Eizellen und Spermien in großer Zahl ins Seewasser, wo die Befruchtung stattfindet. Die einfache Zusammensetzung des Seewassers und die Verfügbarkeit der Spermien und Eizellen in großen Mengen ließen Seeigel zu einem beliebten Studienobjekt und zu einem Modellsystem von Befruchtung und Embryogenese werden.

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beobachtete F.R. Lillie (1913), dass wasserlösliche Stoffe, die von Eizellen stammen, das Bewegungsmuster von Seeigel-Spermien verändern. Diese Eizellstoffe wurden als Peptide identifiziert (Hansbrough & Garbers, 1981; Suzuki et al., 1981) und als Sperm-Activating Peptides (SAPs) (Suzuki, 1995) bezeichnet. Die sezernierten Peptide jeder Seeigelart wirken artspezifisch. Bis heute sind mehr als 70 verschiedene Eizellpeptide bekannt, vornehmlich von Seeigeln und Seesternen (Suzuki, 1995).

Wenn die SAPs an einen spezifischen Rezeptor binden, lösen sie verschiedene zelluläre Reaktionen aus (Abb. 1.4). Es kommt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP- und cGMP-Konzentration, sowie zu Proteinmodifizierungen und zu einem Fluss von Na^+ , K^+ , H^+ und Ca^{2+} -Ionen über die Membran, welche das Membranpotential ändern. Diese zellulären Ereignisse steuern nicht nur Chemotaxis und Motilität der Spermien, sondern auch Zellatmung und akrosomale Exozytose.

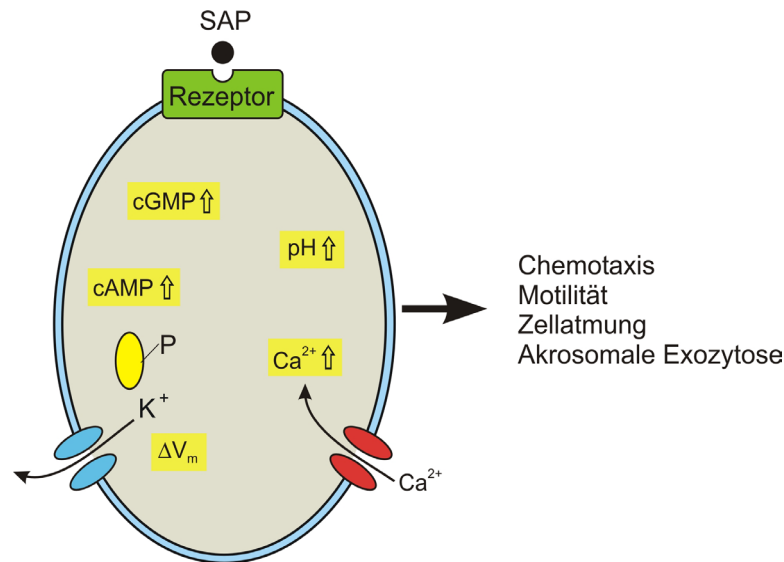


Abbildung 1.4: Effekte von SAPs. Durch Bindung eines SAPs an seinen spezifischen Rezeptor wird ein Signalweg aktiviert. Die cGMP- und cAMP-Konzentration, sowie der pH-Wert steigen an. Der Phosphorylierungszustand verschiedener Proteine ändert sich. Ein K⁺-Ausstrom hyperpolarisiert die Zelle. Die Öffnung von Ca²⁺-Kanälen führt zu einem Ca²⁺-Einstrom und somit zu einer Depolarisation. Die Chemotaxis, die Spermienmotilität, sowie die Zellatmung und akrosomale Exozytose werden durch diese zellulären Prozesse gesteuert.

Die SAPs unterscheiden sich in Größe und Struktur (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). Speract weist eine lineare Struktur auf, während Resact durch eine intramolekulare Disulfid-Brücke eine zirkuläre Struktur ausbildet. Asterosap, das SAP des Seesterns *Asterias amurensis*, ist größer als die beiden Peptide der Seeigel und weist ähnlich wie Resact ebenfalls eine zirkuläre Struktur auf (Yoshino et al., 1991; Nishigaki et al., 1996).

Am besten untersucht sind die Seeigel-Peptide Resact und Speract. Für Resact konnte eine chemotaktische Wirkung auf Spermien von *A. punctulata* zweifelsfrei nachgewiesen werden (Ward et al., 1985). Speract dagegen beeinflusst das Bewegungsmuster von *S. purpuratus*-Spermien nur unter speziellen experimentellen Bedingungen (Cook et al., 1994). Die genaue Funktion von Asterosap ist noch unklar. Die Wirkung von Asterosap auf das Bewegungsmuster von *A. amurensis* Spermien ist noch nicht erforscht. In hohen Konzentrationen (1 μM) wurde Asterosap eine Funktion als Kofaktor für die akrosomale Exozytose (Nishigaki et al., 1996) zugewiesen. In neueren Untersuchungen an Spermien suspensionen konnte gezeigt werden, dass Asterosap in picomolaren Konzentrationen einen Ca²⁺-Einstrom auslöst (Matsumoto et al., 2003; Solzin et al., 2004).

Die Peptide binden spezifisch an Rezeptoren, die im Flagellum des Spermiums lokalisiert sind (Cardullo et al., 1994; Matsumoto et al., 2003). Der Rezeptor für Resact und Asterosap konnte als membranständige Guanylyl-Zyklase (GC) identifiziert werden (Shimomura et al., 1986a; Matsumoto et al., 2003). Unklar ist, ob der Rezeptor für Speract ebenfalls eine membranständige GC ist oder ein mit einer GC assoziiertes Protein (Dangott & Garbers, 1984). Werden Spermien mit SAPs stimuliert, steigt die intrazelluläre cGMP-Konzentration an (Shimomura & Garbers, 1986b; Matsumoto et al., 2003; Kaupp et al., 2003). Neben der schnellen und großen Erhöhung der cGMP-Konzentration bewirkt die Stimulation der Spermien mit SAPs einen langsameren und kleineren Anstieg der cAMP-Konzentration (Godde, 1996; Kaupp et al., 2003; Matsumoto et al., 2003). Nach einem bisher postulierten Modell des chemotaktischen Signalweges in Seeigel-Spermien (Abb. 1.5) sollen K^+ -selektive Kanäle durch eine Erhöhung der cGMP-Konzentration öffnen (Cook & Babcock, 1993b; Galindo et al., 2000), wodurch die Spermienzelle hyperpolarisiert wird. Die Hyperpolarisation soll eine zentrale Reaktion im chemotaktischen Signalweg sein. Durch die Hyperpolarisation soll ein Na^+/H^+ -Austauscher aktiviert werden (Lee & Garbers, 1986), der den intrazellulären pH-Wert erhöht. Sowohl der Anstieg des pH-Wertes als auch die Hyperpolarisation aktivieren eine Adenylyl-Zyklase (AC) (Cook & Babcock, 1993a; Beltrán et al., 1996), die für den Anstieg der cAMP-Konzentration verantwortlich sein soll. Der Anstieg der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide soll einen Ca^{2+} -Einstrom bewirken (Cook & Babcock, 1993a; Kaupp et al., 2003; Matsumoto et al., 2003), der letztendlich zu einer Änderung des Schwimmverhaltens führt. Der Ca^{2+} -Einstrom scheint mit der Konzentration zyklischer Nukleotide zusammenzuhängen, da er durch Phosphodiesterase-Inhibitoren verstärkt wird. Der Ca^{2+} -Einstrom ist für die Chemotaxis von *A. punctulata*-Spermien essentiell (Ward et al., 1985). In Ca^{2+} -freiem Seewasser sind die Spermien zwar noch beweglich, zeigen aber keine Chemotaxis. Das beschriebene Modell beruht vornehmlich auf Untersuchungen an Seeigel-Spermien der Spezies *S. purpuratus* mit dem Peptid Speract. Die Problematik dieses Modells besteht darin, dass eine chemotaktische Wirkung von Speract bis heute nicht gezeigt werden konnte. Neueste Untersuchungen zeigen, dass der Anstieg des intrazellulären pH-Wertes $[pH]_i$ keinerlei Einfluss auf die Chemotaxis hat (Solzin et al., 2004). Auch können zeitaufgelöste kinetische Messungen des Ca^{2+} -Einstroms in *A. punctulata*-Spermien (Kaupp et al., 2003) nach Stimulierung mit dem Lockstoff Resact wesentliche Annahmen des postulierten Modells nicht bestätigen. Entsprechend dem Modell lösen sowohl Resact als auch die Botenstoffe cAMP bzw. cGMP einen Ca^{2+} -Einstrom aus. Bei Stimulierung mit höheren Resact-Konzentrationen (> 50 pM) zeigt der Verlauf des Ca^{2+} -Einstroms zwei kinetische

Komponenten; einen ersten schnelleren Peak-artigen Ca^{2+} -Einstrom (früher Ca^{2+} -Einstrom) gefolgt von einem zweiten langsameren anhaltenden Ca^{2+} -Einstrom (später Ca^{2+} -Einstrom). Die Ca^{2+} -Einströme die durch die intrazelluläre Freisetzung von zyklischen Nukleotide ausgelöst werden, unterscheiden sich in ihrer Kinetik. Zyklisches GMP induziert einen schnellen Ca^{2+} -Einstrom, vergleichbar mit dem Ca^{2+} -Einstrom, der durch niedrige Resackonzentrationen ($< 50 \text{ pM}$) ausgelöst wird. Der cAMP-induzierte Ca^{2+} -Einstrom ist langsamer und anhaltender als der cGMP-induzierte Ca^{2+} -Einstrom. Dies lässt vermuten, dass cAMP und cGMP verschiedene Ca^{2+} -Signalwege aktivieren und nicht - wie im Modell - nacheinander in einer Signalkette geschaltet sind. Da das postulierte Modell experimentell unzureichend abgesichert ist, wird in dieser Arbeit ein vereinfachtes, aber experimentell geprüftes Schema des chemotaktischen Signalwegs angenommen (Abb. 1.6).

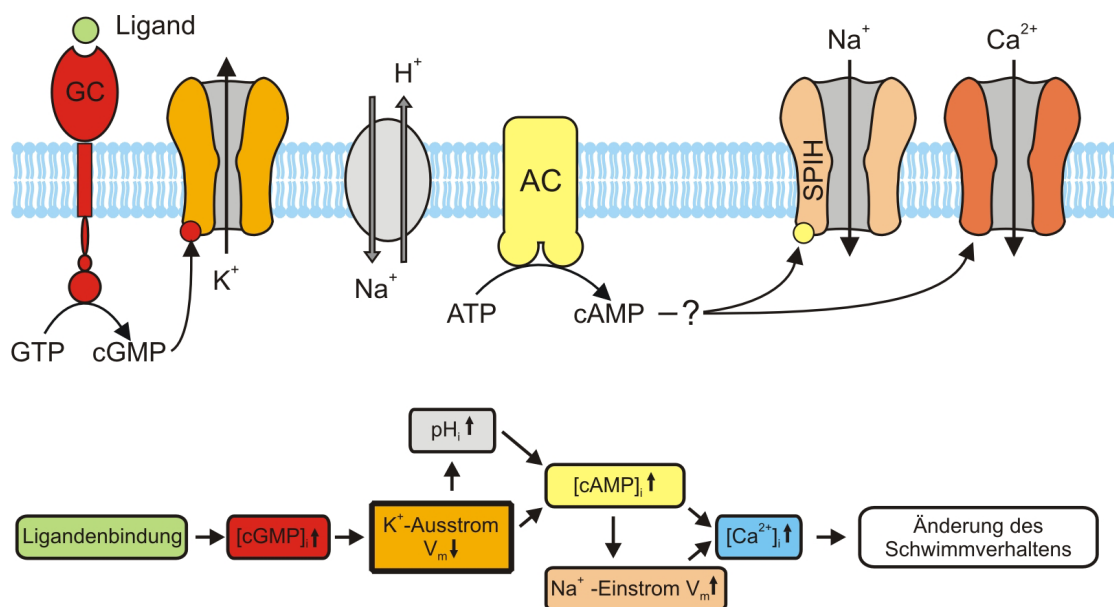


Abbildung 1.5: Modell des zellulären Signalwegs während der Chemotaxis von Seeigel-Spermien (nach Darszon et al., 1999; Darszon et al., 2001). Die Bindung eines Liganden an eine Rezeptor-GC erhöht die intrazelluläre cGMP-Konzentration. Die Spermienzelle hyperpolarisiert aufgrund der Öffnung von cGMP-regulierten K⁺-Kanälen. Die Hyperpolarisation aktiviert einen Na⁺/H⁺-Austauscher, der den intrazellulären pH-Wert erhöht. Sowohl die Hyperpolarisation als auch der Anstieg des pH-Wertes aktivieren eine AC. Durch den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt es zu einem Ca²⁺-Einstrom, der eine Änderung des Schwimmverhaltens hervorruft.

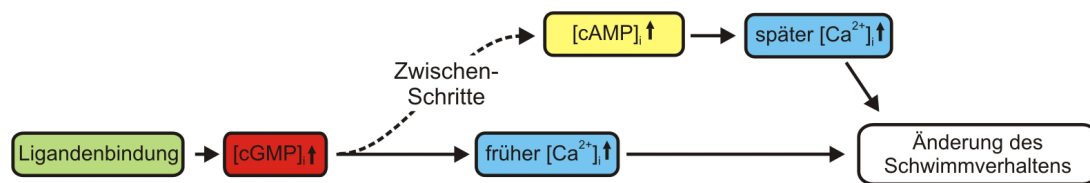


Abbildung 1.6: Vereinfachtes Schema des chemotaktischen Signalwegs. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide. Die Botenstoffe cGMP und cAMP aktivieren wahrscheinlich verschiedene Signalwege, die zu einem Ca^{2+} -Einstrom und zu einer Änderung des Schwimmverhaltens führen.

Welche Ionenkanäle für die Ca^{2+} -Einströme verantwortlich sind, ist noch unbekannt. Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle), die auch für Ca^{2+} permeabel sind, konnten in Seeigelspermien bisher noch nicht nachgewiesen werden. Die Mechanismen, die zu einem Ca^{2+} -Einstrom führen werden kontrovers diskutiert. Aus der Flagellenmembran von *S. purpuratus*-Spermien konnte ein Ionenkanal isoliert werden der zur Familie der HCN-Kanäle gehört (Gauss et al., 1998). Diese Kanäle sowie die CNG-Kanäle gehören zur Familie der nicht-selektiven Kationkanäle (zur Übersicht: Kaupp & Seifert, 2002) (Abb. 1.7). HCN-Kanäle sind spannungsgesteuert und werden durch zyklische Nukleotide moduliert. Eine Hyperpolarisation könnte diesen Kanal aktivieren. Durch die Bindung von cAMP an das Kanalprotein wird die Offenwahrscheinlichkeit deutlich erhöht. Dieser Ionenkanal leitet sowohl K^+ als auch Na^+ -Ionen. Wenn dieser Kanal öffnet, kommt es zu einem Na^+ -Einstrom, der die Spermienzelle depolarisiert. Diese Depolarisation könnte spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktivieren. Verschiedene spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle konnten in Seeigel-Spermien nachgewiesen werden. Sie werden aber vorwiegend mit der akrosomalen Exozytose in Verbindung gebracht (Liévano et al., 1990; Beltrán et al., 1994; Darszon et al., 1999). Ebenso wird vorgeschlagen, dass der Ca^{2+} -Einstrom durch einen cAMP-regulierten Ca^{2+} -Kanal (Cook & Babcock, 1993a) oder über einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Schackmann & Chock, 1986) erfolgen könnte.

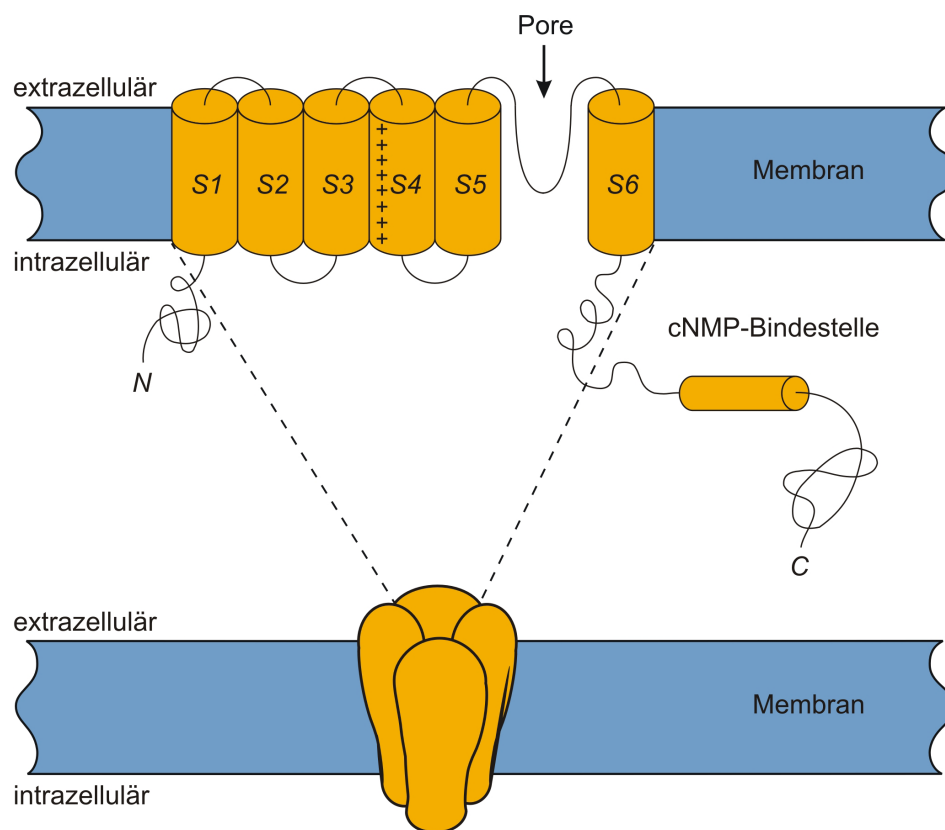


Abb. 1.7: Transmembranale Topologie einer HCN-bzw. einer CNG-Kanaluntereinheit. Der obere Teil der Abbildung zeigt die transmembranale Topologie. Mit S1-S6 sind die transmembranalen Segmente bezeichnet. Die Bindestelle für zyklische Nukleotide ist durch „cNMP-Bindestelle“ gekennzeichnet. Im unteren Teil ist die tetramere Struktur der Kanäle dargestellt.

Wie Ca^{2+} eine Änderung des Schwimmverhaltens auslöst und insbesondere wie dieses Verhalten in einem Lockstoff-Gradienten aussieht, ist nicht bekannt. Untersuchungen an Spermien, deren Membran durch Behandlung mit Detergenzien für Ionen permeabel gemacht wurden, zeigen, dass die Ca^{2+} -Konzentration die Asymmetrie des Flagellenschlages und damit das Schwimmverhalten kontrolliert (Brokaw, 1979). Bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen ist die Asymmetrie des Flagellenschlages höher als bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen. Nur die Beobachtung der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an einzelnen schwimmenden Spermien im Lockstoff-Gradienten könnte Aufschluss darüber geben, wie eine Spermienzelle zur Eizelle navigiert. In einem ersten Ansatz ist es Wood et al. (2003) gelungen die intrazelluläre Ca^{2+} -Änderung an einzelnen immobilisierten Spermien des Seeigels *S. purpuratus* zu beobachten. In intakten Spermien wurden durch Stimulierung mit Speract sowohl im Kopf als auch im Flagellum Ca^{2+} -Oszillationen ausgelöst.

1.4 Zielsetzung

Spermien antworten auf Peptide, die von der Eizelle freigesetzt werden mit einer Änderung des Schwimmverhaltens. Für einige marine Invertebraten ist nachgewiesen, dass diese Peptide chemotaktisch wirken und das Aufeinandertreffen von Eizelle und Spermien erleichtern. Das chemotaktische Schwimmverhalten von Spermien ist bisher unzureichend untersucht worden. Es ist nicht bekannt wie sich Spermien in einem definierten Lockstoff-Gradienten verhalten. Spermien des Seeigels *A. punctulata* reagieren auf Stimulation mit dem Lockstoff Resact und dem intrazellulären Botenstoff cGMP mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Vorangegangene Untersuchungen konnten nur indirekte Hinweise dafür geben, dass die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Änderung des Schwimmverhaltens führt. Des Weiteren ist nicht bekannt, welches Kanalprotein für den cGMP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich ist. Es ist naheliegend zu vermuten, dass es sich um einen zyklisch-nukleotid gesteuerten Ionenkanal (CNG-Kanal) handelt. Ebenso könnte ein K^{+} -selektiver CNG-Kanal nach einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration für eine Hyperpolarisation der Zelle verantwortlich sein.

In dieser Arbeit sollte das Schwimmverhalten von Spermien mariner Invertebraten sowohl nach Freisetzung des intrazellulären Botenstoff cGMP als auch in einem Lockstoff-Gradienten analysiert werden. Ebenfalls sollte geprüft werden, ob Asterosap, das Eizellpeptid des Seesterns *A. amurensis*, eine chemotaktische Wirkung besitzt. Mit Hilfe von Laser-Fluoreszenz Mikroskopie sollten die Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an einzelnen, schwimmenden Spermien beobachtet werden. Die simultane Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und des Schwimmverhaltens nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP bzw. in einem Lockstoff-Gradienten sollten 1. den direkten Nachweis für eine Änderung des Schwimmverhaltens durch eine Peptid-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erbringen und 2. Hinweise darauf geben, wie das Schwimmverhalten im Gradienten gesteuert wird. Um die molekularen Grundlagen des chemotaktischen Signalweges aufzuklären, sollte ein Gen eines CNG-Kanals aus einer Hoden cDNA-Bibliothek des Seeigels *A. punctulata* kloniert werden. Ein solcher CNG-Kanal könnte nach einem intrazellulären cGMP-Anstieg sowohl für die Hyperpolarisation der Zelle als auch für den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verantwortlich sein. Ziel ist es, den Mechanismus der Bewegungskontrolle der Chemotaxis auf molekularer Ebene soweit wie möglich zu entschlüsseln.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Lösungen

Es wurden Chemikalien in p.A. Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), Pierce (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Riedel-de Haën AG (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und USB (Bad Homburg) bezogen. Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), GIBCO BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), NEB (Schwalbach) und Roche (Mannheim) geliefert. Für die Erhaltung und Vermehrung von Bakterienkulturen wurden Medien von der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet. Radionukleotide wurden von Amersham Pharmacia Biotech geliefert. Für den Transfer von Nukleinsäuren wurden Membranen von Pall (Dreieich) verwendet. Für die Autoradiographie wurden X-OMAT AR Röntgenfilme von Kodak und für die Chemilumineszenz ECL Hyperfilme von Amersham Pharmacia Biotech verwendet.

Calcium-Indikator Farbstoffe wurden von Molecular Probes (Eugene, OR, USA) und optische Filter wurden von den Firmen Schott (Mainz), Omega Optical (Brattleboro, USA) und Chroma (Brattleboro, USA) bezogen.

Alle Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Soweit erforderlich, wurden die Lösungen durch Autoklavieren (20 min; 121°C) sterilisiert.

Für die Experimente mit *Arbacia punctulata* und *Asterias amurensis* wurde *artificial seawater* (ASW) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

423 mM	NaCl
9 mM	KCl
22,94 mM	MgCl ₂
25,5 mM	MgSO ₄
9,27 mM	CaCl ₂
0,1 mM	EDTA
10 mM	HEPES

Der pH-Wert der ASW-Lösung wurde durch Zugabe von NaOH auf pH 7.8 eingestellt.

2.1.1 Käfigverbindungen (*caged compounds*)

Die Verwendung von photoaktivierbaren Verbindungen gilt als elegante Methode zur Erzeugung schneller Konzentrationssprünge von Biomolekülen innerhalb einer Zelle. Gemeinsam mit Dr. V. Hagen und Dr. M. Beyermann vom Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin sind Käfigverbindungen oder so genannte *caged compounds* sowohl der Botenstoffe cAMP/cGMP (cNMP) als auch des Lockstoffs Resact entwickelt worden. Diese *caged compounds* ermöglichen eine zeit- und raum aufgelöste Analyse der Verhaltensreaktion der Spermien durch Freisetzung von cNMP bzw. Resact zu einem definierten Zeitpunkt. Durch eine chemische Modifikation in Form einer photolabilen Käfig- oder Schutzgruppe sind diese Verbindungen inaktive Derivate von biologisch aktiven Molekülen. Durch einen UV-Blitz wird die Schutzgruppe abgespalten und die entsprechende Substanz (cNMP bzw. Resact) wird innerhalb kürzester Zeit (≤ 1 ms; siehe auch Tab.2.1) freigesetzt.

In dieser Doktorarbeit sind die [6,7-Bis(Ethoxycarbonylmethoxy)Coumarin-4-yl]methyl-substituierte Form von cGMP (BECMCM-caged-cGMP), die (7-Diethylamino-Coumarin-4-yl)methyl-substituierte Formen von cNMP (DEACM-*caged* cNMP) und die am Cys⁸ mit [S-(4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl)] modifizierte Form von Resact (*caged* Resact) verwendet worden. Die Eigenschaften der BECMCM-bzw. DEACM-*caged*-cNMP und *caged* Resact sind in den zwei folgenden Abschnitten beschrieben. Die Käfigverbindungen der zyklischen Nukleotide wurden zu einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. *Caged Resact* wurde in 10 mM Zitronensäure/10 mM DTT in einer Konzentration von 1 mM angesetzt, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Einmal aufgetaute Aliquots wurden direkt verwendet. Reste der aufgetauten Lösung wurden verworfen.

2.1.1.1 *Caged*-zyklische Nukleotide

Die Eigenschaften einer *caged*-Verbindung hängen in erster Linie von der Natur der chemischen Schutzgruppe ab. In Tabelle 2.1. sind die Eigenschaften einiger *caged*-cNMP Verbindungen aufgeführt (aus Kaupp & Seifert, 2002).

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

- Die Löslichkeit der Verbindungen sollte hoch sein. Je höher die Konzentration in der Zelle ist, umso mehr kann durch einen UV-Blitz freigesetzt werden bzw. desto weniger UV-Lichtenergie muss verwendet werden.
- Die Verbindungen sollten gegen Solvolyse resistent sein (die Schutzgruppe ist an das Nukleotid über eine Estergruppe gekoppelt, die in wässriger Lösung hydrolysiert werden kann).
- Die Absorption und Quantenausbeute der Verbindungen sollte möglichst hoch sein, um eine hohe Photoeffizienz zu erlangen.
- Die photolytische Spaltung sollte im Vergleich zu der untersuchten physiologischen Reaktion schnell sein (≤ 1 ms).
- Das Absorptionsmaximum der Verbindungen sollte möglichst im längerwelligen UV-Bereich des Spektrums liegen, um eine Schädigung der Zellen mit kurzwelligen UV-Blitzen zu vermeiden.

Die BECMCM-*caged* cNMP sind neuartige Verbindungen (Hagen et al., 2001; Hagen et al., 2002), deren spektrale Eigenschaften mit den BCMCM-*caged* Verbindungen übereinstimmen (Tab. 2.1). Neben der relativ hohen Löslichkeit der BECMCM-*caged*-Verbindungen ist ein weiterer Vorteil, dass sie sich in der Zelle anreichern können (Abb.2.1.). Wegen ihrer Hydrophobizität und Neutralität ist diese Verbindung gut membrangängig. Im Zellinnern werden die Ethoxycarbonyl-Ester der Schutzgruppe durch unspezifische Esterasen abgespalten, so dass ein bis zwei Carboxyl-Gruppen an der Schutzgruppe freigesetzt werden. Ohne die 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, sollte es sich in den Zellen anreichern. Dies wurde aber bisher nicht systematisch und quantitativ geprüft. Erste Versuche von U.B.Kaupp und T. Strücker deuten eher darauf hin, dass sich die *caged*-Verbindung nicht anreichert.

Tabelle 2.1: Eigenschaften einiger *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.

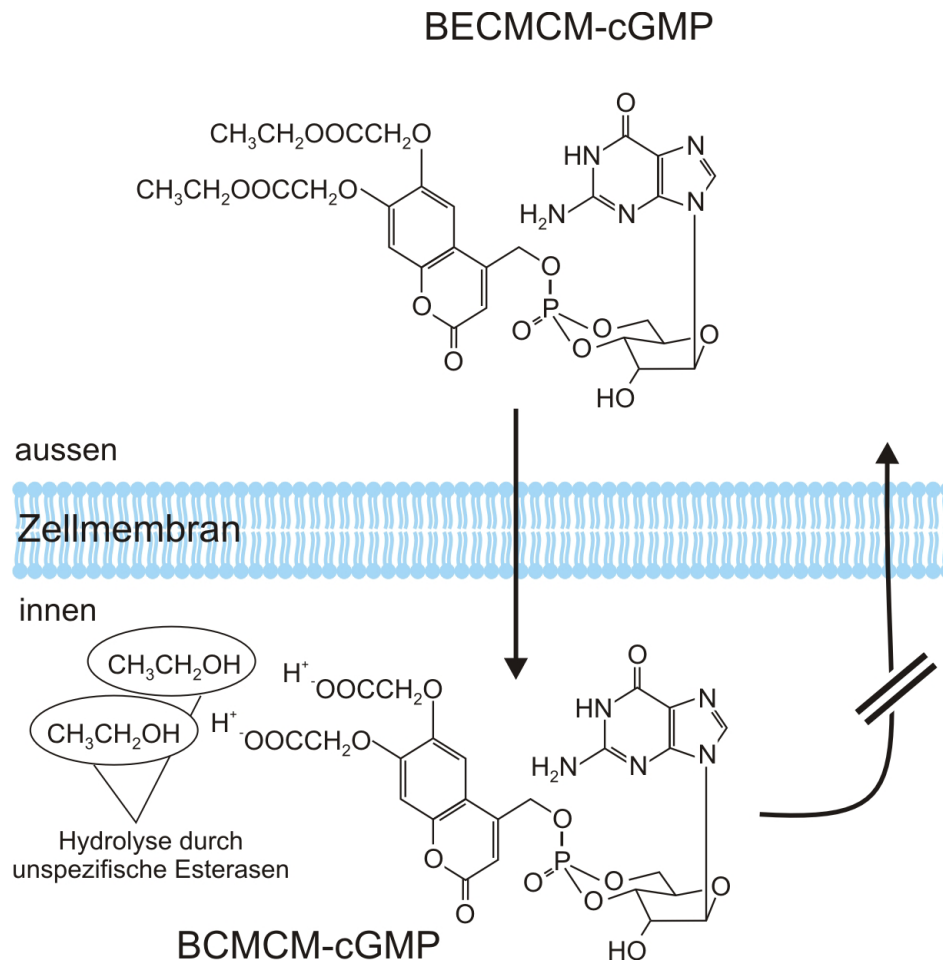


Abbildung 2.1: Anreicherung von BCMCM-caged-cGMP in der Zelle durch Hydrolyse. BECMCM-caged-cGMP passiert als hydrophobe und neutrale Verbindung die Zellmembran. Innerhalb der Zelle werden durch unspezifische Esterasen die Ethoxycarbonyl-Ester gespalten und setzen zwei Carboxyl-Gruppen an der Schutzgruppe frei. Das entstandene geladene BCMCM-caged-cGMP kann die Zellmembran nicht mehr passieren und reichert sich im Innern der Zelle an.

2.1.1.2 Caged Resact

Das Lockstoff-Peptid Resact wurde am Cys⁸ über einen Thioester mit der Schutzgruppe 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB) kovalent gekoppelt (Abb. 2.2). In kinetischen Vergleichsmessungen (Kaupp et al., 2003) wurde gezeigt, dass die Wirksamkeit von *caged* Resact, in Spermiesuspensionen ein Ca²⁺-Signal auszulösen um das ~ 3000-fache verringert ist. Die Quantenausbeute von *caged* Resact liegt bei 0,035 (Solzin, 2003). Das Absorptionsmaximum und der Absorptionskoeffizient wurden bisher nicht bestimmt. Sie sollten jedoch vergleichbar mit anderen caged-DMNB-Verbindungen sein (siehe Tab.

2.1.1.1), da die Eigenschaften weitgehend durch die Photochemie der Schutzgruppe bestimmt werden.

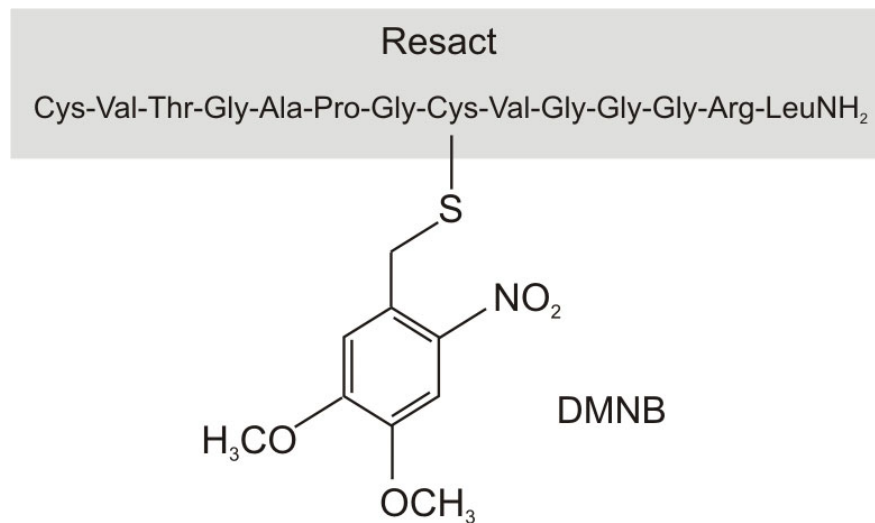


Abbildung 2.2: Strukturformel von DMNB-caged Resact. Resact ist über das Cystein an der Position 8 über einen Thioester kovalent an 4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl (DMNB) gekoppelt.

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung der Seeigel

A. punctulata-Seeigel wurden vom Duke University Marine Laboratory (H.D. Huang, 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.

2.2.2 Entnahme der Spermien

A. punctulata Seeigel-Spermien wurden nach Injektion von 0,5 -1 ml 0,5 M KCl in das Coelom des Seeigels (nach Palmer, 1937; Silver et al., 1980) mit einer Pasteurpipette aufgenommen. Das austretende Sperma wird als *dry sperm* bezeichnet. Die Seeigel-Spermien wurden auf Eis aus Woods Hole geschickt.

A. amurensis Seestern-Spermien wurden nach der Methode von Matsui et al. (1986) gewonnen. *Dry sperm* von *A. amurensis* wurde von M. Matsumoto, Center For Life Science and Technology, Keio University, Japan, zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Vitalitätsbestimmung der Spermien

Die Beweglichkeit der Spermien von *A. punctulata* und *A. amurensis* wurde als Kriterium für ihre Vitalität genommen. 50 µl einer 1:100 bis 1:1000 Verdünnung des *dry sperm* wurden in eine Beobachtungskammer pipettiert und in einem Dunkelfeld-Mikroskop betrachtet. Wenn ca. 80 % der Spermien motil waren, wurden sie für Experimente verwendet.

2.2.4 Analyse des Schwimmverhaltens unter dem Dunkelfeld-Mikroskop

Die Dunkelfeldmikroskopie ist eine spezielle Variante der Lichtmikroskopie, mit der insbesondere durchsichtige und kontrastarme Objekte ohne Färbung untersucht werden können. Dies ist bei Hellfeld-Beleuchtung nur unzureichend möglich. Besonders vorteilhaft ist die Tatsache, daß ohne die Notwendigkeit zur Färbung auch lebende Objekte beobachtet werden können. Die Unterschiede in der Beleuchtung zwischen der Hellfeldmikroskopie und der Dunkelfeldmikroskopie sind in Abb. 2.3 schematisch dargestellt. Bei der Dunkelfeldmikroskopie wird die Streuung an Partikeln oder Strukturen des Präparates ausgenutzt. Das direkt von der Lichtquelle des Mikroskops kommende Licht wird am Objektiv vorbei geleitet (Abb. 2.3 B). Das Gesichtsfeld bleibt daher selbst bei eingeschalteter Mikroskopierlampe dunkel. Nur Licht, welches durch die Strukturen des Präparates im Strahlengang gestreut wird, gelangt in das Objektiv und erzeugt dort ein Bild mit hellen Strukturen auf dunklem Untergrund. In diesem Bild sind damit meist immer nur die äußeren Konturen der Objekte im Präparat, jedoch keine oder nur wenig innere Strukturen wie z.B. zelluläre Bestandteile erkennbar.

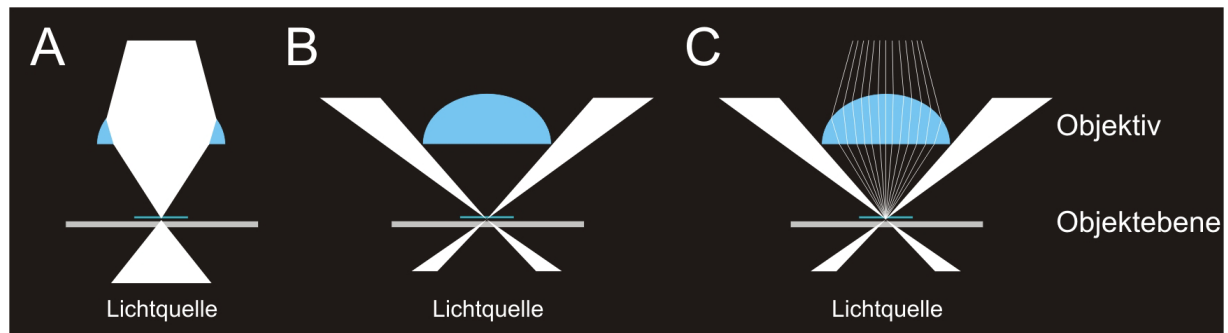


Abbildung 2.3: Vergleich zwischen Hellfeld- und Dunkelfeldbeleuchtung in der Mikroskopie. (A) Hellfeldbeleuchtung. Das Präparat wird von einem Lichtkegel beleuchtet. Die Beleuchtung im Hellfeld-Mikroskop wird so eingestellt, dass möglichst das gesamte vom Präparat ausgehende Licht in das Objektiv gelangt. Im mikroskopischen Bild erscheint das Präparat dann dunkel auf hellem Untergrund. (B) Dunkelfeldbeleuchtung. Beim Dunkelfeldmikroskop gelangt kein direktes Mikroskopierlicht in das Objektiv. Das Präparat wird nicht mit einem Kegel, sondern mit einem Kegelmantel beleuchtet. Befindet sich kein Präparat im Strahlengang, so bleibt bei der Dunkelfeldbeleuchtung das Gesichtsfeld dunkel. (C) Wird ein Präparat in den Strahlengang gebracht, so kommt es zu einer teilweisen "Streuung" des Mikroskopierlichts an den Präparatstrukturen durch Lichtbrechung, Reflexion und durch Beugung. Dieses Streulicht gelangt nun teilweise in das Objektiv und erzeugt im Mikroskop ein sichtbares Bild. Die mikroskopischen Objekte werden hell leuchtend auf einem dunklen Hintergrund dargestellt.

In dieser Arbeit wurde zur Beobachtung des Schwimmverhaltens der Spermien ein inverses Dunkelfeldmikroskop (ICM 405; Neofluar Objektive 10/0.3; Zeiss, Oberkochen) verwendet. Als Lichtquelle zur Beleuchtung diente eine 100-W Halogenlampe. Um die thermische Belastung der Spermien zu minimieren, wurde der Infrarot-Anteil des Lampenlichts durch einen Hitzeschutzfilter und einen Langpass-Filter (KG3 und OG515; Schott, Mainz) im Beleuchtungsstrahlengang unterdrückt. Zur Beobachtung der Spermien wurde eine temperierbare Beobachtungskammer konstruiert (Abb. 2.4 A). Die Beobachtungskammer hatte einen Durchmesser von 20 mm und eine Tiefe von ca. 60 μm (Volumen $\sim 20 \mu\text{l}$). Der Boden der Beobachtungskammer bestand aus einem Deckgläschen. Die Kammer wurde nach oben hin mit einem Objektträger (1 mm) abgedeckt. Mit Hilfe eines Durchlauf-Wasserbades wurde die Temperatur der Kammer auf 17 °C gehalten. Das Schwimmverhalten wurde mit einer CCD-Videokamera (CF8/1FMC; Kappa, Gleichen; Bildfrequenz 50 Hz) mit einer Belichtungszeit von 1-4 ms und einer digitalen TV-Karte (WinTV-PVR USB/PCI; Hauppauge, Mönchengladbach) aufgezeichnet. Die aufgezeichneten Filmdateien wurden analysiert und die Schwimmbahnen oder auch Trajektorien der Spermien wurden mit Hilfe eines Computer-Programms, geschrieben in MatLab 6.5 (Mathworks, Unterföhring), konstruiert.

Für die Beobachtung des Schwimmverhaltens einzelner Spermien wurden die Spermien $1:10^4$ bis $1:10^5$ in ASW verdünnt, welches 0,2 % Pluronic F-127 enthielt. Pluronic verhindert ein Anhaften der Spermien an den Glaswänden der Beobachtungskammer. Für Lockstoff-Experimente an Seeigel-Spermien enthielt das ASW zusätzlich noch eine entsprechende Konzentration an caged Resact (50 nM bis 1 μ M).

Für Experimente mit zyklischen Nukleotiden wurde *dry sperm* 1:6 in ASW, welches 0,5 % Pluronic und 50 μ M (in Experimenten mit *A. punctulata*) bzw. 100 μ M (in Experimenten mit *A. amurensis*) des entsprechenden DEACM-caged cNMP enthielt, verdünnt und 1 h bei 16 °C inkubiert (Inkubationsansatz). Die caged zyklischen Nukleotide wurden durch einen UV-Blitz (U-UHL 100-W Hg-Lampe und U-RFL-Brenner; Olympus, Hamburg) von 30 ms Dauer photolysiert. Die Blitzdauer konnte durch einen elektro-mechanischen Photoverschluß eingestellt werden (LS6Z2 und VMM-T1; Uniblit, Vincent Ass., Rochester, N.Y., USA). Der Blitz wurde mit Hilfe eines Lichtleiters über einen dichroischen Spiegel (DCLP 405) durch das Objektiv geleitet. Die Fläche, die vom Blitz belichtet wird, konnte durch eine Rechteck-Blende (TILL Photonics, Martinsried) eingeschränkt werden. Eine UV-Belichtung der Spermien ohne vorherige Inkubation mit caged zyklischen Nukleotiden oder caged resact im ASW führte zu keiner Verhaltensänderung der Spermien.

Für Asterosap-Experimente an Seestern-Spermien wurde die synthetische Isoform P 15 (GQTQFGVC*IARVRQQHQGQDEASIFQAILS-QC*QS, intramolekulare Disulfidbrücke zwischen den zwei Cys*) des Eizellpeptids Asterosap verwendet. Asterosap wurde in ASW gelöst (1 μ M) und mit einer Microliter-Spritze (701 N Hamilton, Bonaduz, Schweiz) durch eine Kapillare in die Beobachtungskammer injiziert. Die Kapillare wurde aus einer Plastikpipetten-Spitze hergestellt. Das injizierte Volumen betrug etwa 0,1 -0,3 μ l. Alle Experimente wurden bei 17 °C durchgeführt.

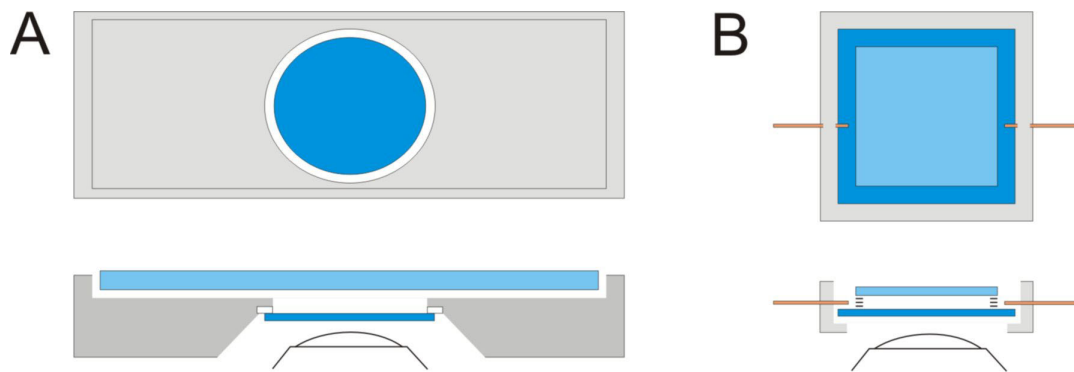


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau der in dieser Arbeit für die Mikroskopie verwendeten Beobachtungskammern. (A) Kammer für die Dunkelfeld-Mikroskopie. Oben: Vorderansicht; unten: Seitenansicht. Als Boden diente ein rundes Deckgläschen (Ø 20 mm) (dunkelblau), welches mit Dichtungsmasse an den Rahmen aus Kunststoff (grau) geklebt wurde. Ein zugeschnittener Objektträger (hellblau) wurde zur Abdeckung benutzt. Die so hergestellten Kammern hatten je nach Dicke der Dichtungsmasse eine Tiefe von 40-70 µm. Die Kammer wurde nach jeder Messung gereinigt und wieder verwendet. (B) Kammer für die Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie. Oben: Vorderansicht; unten: Seitenansicht. Ein Deckgläschen (22 mm x 22 mm) (dunkelblau) wurde mit Vakuumfett an den Rahmen (grau) gehaftet. Ein kleineres Deckgläschen (18 mm x 18 mm) (hellblau) diente als Abdeckung. Mehrere Schichten Klebefolie am Rand der Abdeckung dienten als Abstandshalter. Durch die an den Seiten angebrachten Kanülen (braun) wurde bei *A. amurensis* Experimenten mittels einer Kapillare der Lockstoff in die Kammer injiziert. Die so hergestellten Kammern hatten je nach Schichtdicke der Klebefolie eine Tiefe von 20 -30 µm. Nach einer Messung wurde die Probe zusammen mit den Deckgläschen verworfen. Für jede neue Messung wurden neue Deckgläschen verwendet.

2.2.5 Beobachtung der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in einzelnen Spermien unter dem Fluoreszenz-Mikroskop

Die Fluoreszenz-Mikroskopie erlaubt mit hoher Sensitivität und Selektivität spezifische Vorgänge in der Zelle *in vivo* zu verfolgen. Durch die Verwendung von geeigneten Fluorophoren, z.B. solchen, die ihre Fluoreszenz bei Bindung mit Ionen ändern, ist es möglich, die Änderungen von intrazellulären Ionenkonzentrationen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Mg^{2+} in lebenden Zellen zu beobachten.

Für die Beobachtung der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde der Fluoreszenz-Indikator Fluo-4 (Molecular Probes) verwendet. Die Spermien wurden mit dem membrangängigen Acetoxymethylester des Fluo-4 (Fluo-4AM) inkubiert, das sich in den Spermien anreichert. (zur Übersicht: Haugland, 2005). Die Inkubation der Spermien mit Fluo-4 erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben mit dem Unterschied, dass ASW noch zusätzlich 20-40 µM Fluo-4 enthielt

und die Inkubationszeit mit dem Farbstoff 2-4 h betrug. Die optimale Spermiedichte in der Beobachtungskammer für die Calcium-Messungen wurde durch Verdünnen mit ASW eingestellt ($1:10^4$ - $1:10^5$). Spermien wurden in einer Beobachtungskammer (Abb.2.4 B) durch ein Inverses-Mikroskop (IX70, Olympus, Hamburg) beobachtet. Der Boden und der Deckel der Kammer bestanden aus Deckgläschen (Boden: 22 mm x 22mm; Deckel: 18 mm x 18 mm; 0,17 mm Dicke). Als Abstandshalter zwischen Boden und Deckel dienten mehrere Schichten einer Klebefolie. Je nach Schichtdicke hatte die Kammer eine Tiefe von ca. 20 -30 μ m (Volumen $\sim$ 5-8 μ l). Die Temperatur der Kammer wurde mit Hilfe eines Durchlauf-Wasserbades auf 17 °C gehalten.

Die Fluoreszenz des Ca^{2+} -Indikators wurde mit einem Ar-Ionen Laser (Stability 2018, Spectra-Physics, Darmstadt) bei $\lambda = 488$ nm angeregt. Das Laserlicht mit einer Leistung von ca. 25 mW wurde über einen Lichtleiter durch eine Öffnung eines Dual-Port Imaging Kondensors (TILL Photonics) zum Mikroskop in den Epifluoreszenz-Eingang geführt. Der Lichtleiter vibrierte, um die räumliche Kohärenz des Laserlichts zu reduzieren. Der UV-Blitz für die Photolyse der *caged compounds* (UV-Flash unit; TILL Photonics) wurde mit einem weiteren Lichtleiter zur zweiten Öffnung des Dual-Port Kondensors geführt. Für jedes Experiment wurde der UV-Blitz manuell ausgelöst und nach der Koehler'schen Beleuchtungsmethode in die Objektebene abgebildet. Das UV-Licht wurde durch einen Kurzpass-Filter (410 nm, TILL Photonics) reflektiert und gefiltert. Die belichtete Fläche wurde über eine Rechteck-Blende (TILL Photonics, Martinsried) begrenzt.

Das Licht von beiden Öffnungen des Kondensors wurde über einen dichroischen Spiegel (500DLRP, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) in den optischen Weg des Mikroskops reflektiert. Die Fluoreszenz der Probe wurde über das Objektiv (UApo/340 20/0.75; Olympus) gesammelt und durch ein Emissionsfilter (535DF30, Omega Optical) gefiltert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einer Peltier-gekühlten CCD-Kamera (CoolSnap HQ; Roper Scientific, Trenton, N.J., USA). Für jedes Experiment wurde eine Serie von 100 bis 300 Bildern aufgenommen. Um scharfe Abbildungen der sich schnell bewegenden Spermienzellen zu erhalten, wurde die Probe mit Hilfe eines mechanischen Photoverschlusses (Uniblitz LS6, Vincent Ass.) stroboskopisch belichtet. Die Bildaufnahme-Frequenz der Kamera wurde mit der Belichtungs-Frequenz des Photoverschlusses synchronisiert. Die Steuereinheit des mechanischen Photoverschlusses war über einen Computer mit der Kamera verbunden. Der Aufbau des Laser-Fluoreszenz Mikroskopiostandes ist in Abb. 2.5 skizziert. Ein Diagramm des Zeitverlaufs für die stroboskopische Bildaufnahme ist in Abb. 2.6 dargestellt.

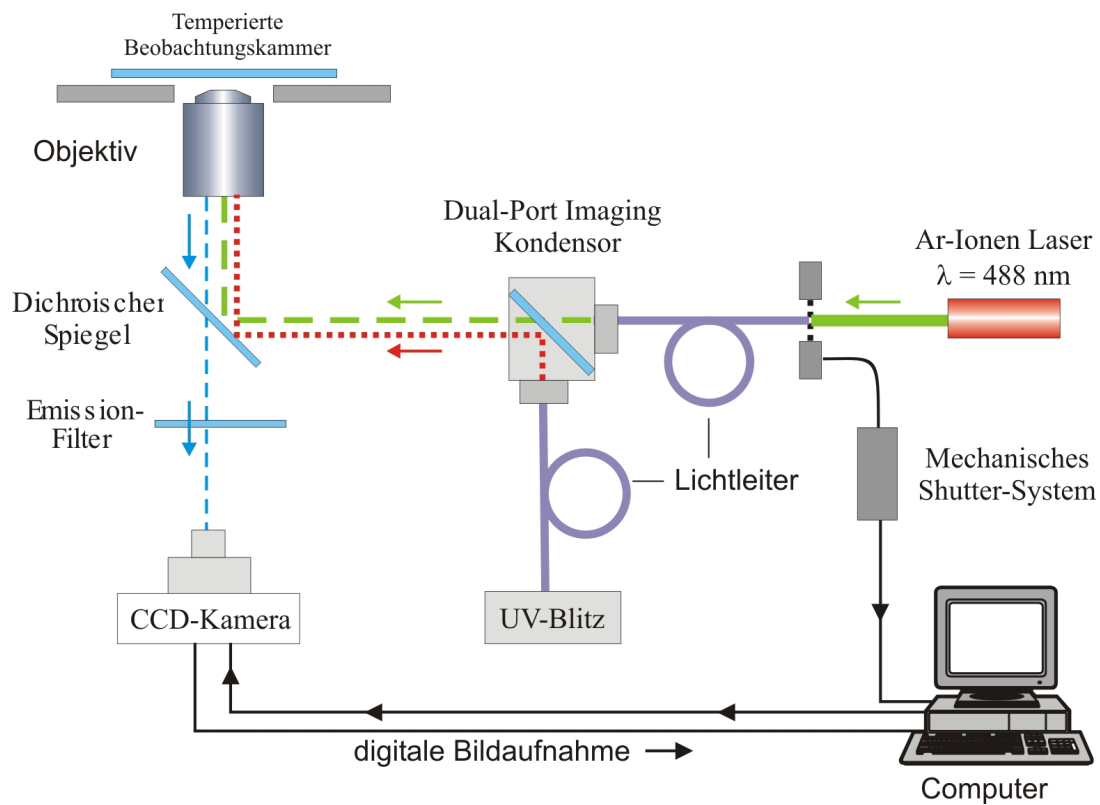


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau des Laser-Fluoreszenz Mikroskopiostandes. Das Anregungslicht des Lasers ($\lambda = 488 \text{ nm}$) (grün) wurde mit einem Lichtleiter in die erste Öffnung des Dual-Port Imaging Kondensor geführt. Der UV-Blitz (rot gepunktet) wurde ebenfalls mit einem Lichtleiter in die zweite Öffnung des Dual-Port Imaging Kondensors geleitet. Licht aus beiden Öffnungen des Dual-Port Kondensors wurde über einen dichroischen Spiegel durch das Objektiv zur Probe reflektiert. Die Fluoreszenz der Probe (blau getrichelt) wurde über einen dichroischen Spiegel und einen Emmisionsfilter gefiltert und in die CCD-Kamera geleitet. Die digitale Bildaufnahme erfolgte durch einen an die Kamera angeschlossenen Computer. Über denselben Computer wurde die Belichtungsfrequenz des mechanischen Shutter-Systems mit der Aufnahme-Frequenz der CCD-Kamera synchronisiert.

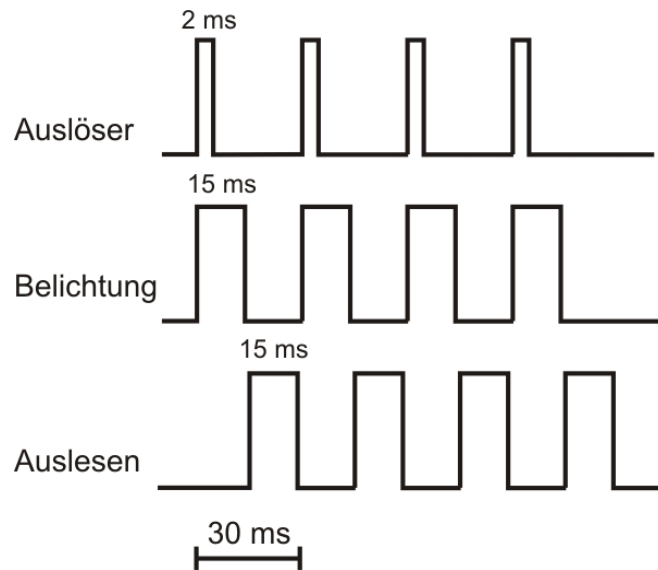


Abbildung 2.6: Diagramm des Zeitverlaufs der Belichtung bzw. Bildaufnahme der CCD-Kamera. Die Steuereinheit des mechanischen *Shutter-Systems* gibt bei jeder Öffnung der Blende einen Impuls (Dauer ca. 2ms) über den Computer an die CCD-Kamera weiter, woraufhin die Kamera die Belichtung (Dauer 15 ms) für jeweils ein Bild startet. Danach erfolgt das digitale Auslesen der Bild-Informationen (Dauer 15 ms). Das bedeutet, dass für ein Bild minimal eine Zeit von 30ms benötigt wird. Dadurch ergibt sich eine maximale Bildaufnahme-Frequenz von 33.3 Hz.

Um einen Lockstoff-Konzentrationsgradienten mit Hilfe von *caged resact* in der Beobachtungskammer zu erhalten, wurde die Rechteckblende vollständig geöffnet und der UV-Blitz leicht defokussiert. Das daraus resultierende Profil der räumlichen Verteilung der Lichtenergie des Blitzes wurde anhand der Intensitätsverteilung des Lichtes gemessen. Es wurde angenommen, dass die Menge an freigesetztem Resact der Intensitätsverteilung des Lichtes entspricht. Es ist nicht bekannt, wie viel Resact mit einem UV-Blitz freigesetzt wird. Daher wurden im Profil des Gradienten nur relative Resact-Konzentrationen angegeben.

Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte halb-automatisch. Um den Kopf oder das Flagellum der Spermien wurde digital eine Maske erzeugt. Dabei dienten die Ortskoordinaten des Kopfes bzw. des Flagellums als Mittelpunkt der Maske. Der Mittelpunkt der Maske wurde schrittweise um ein Element sternförmig erweitert, bis die Maske die Dimension des Kopfes oder des Flagellums eingenommen hatte. Durch Multiplikation der einzelnen Maskenelemente mit den zugehörigen Pixelwerten eines Bildes konnte die Fluoreszenz in Photonen pro Kopf bzw. Flagellum für jedes Bild bestimmt werden.

Der Aufbau des Laser-Fluoreszenz Mikroskopiostandes sowie die digitale Auswertung der Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe von Dr. M. Böhmer durchgeführt.

2.2.6 Aufnahme und Analyse der Schwimmtrajektorien

Folgende lokale Parameter wurden mit Hilfe der Trajektorie bestimmt: Die Ortskoordinate des Spermiums, die Schwimmgeschwindigkeit und die lokale Krümmung entlang der Trajektorie. Die Trajektorie wurde mittels der Koordinaten des Kopfes und der Koordinaten entlang des Flagellums konstruiert. Es wurden nur Trajektorien analysiert, welche die folgenden Kriterien erfüllten: 1. Die Koordinaten können eindeutig einer Spermienzelle zugeordnet werden, 2. Die Spermienzelle bleibt während der gesamten Dauer der Bildaufnahme in der fokalen Ebene der Beobachtungsfläche, 3. Die Spermienzelle zeigt nach Stimulation eine erkennbare Änderung des Schwimmverhaltens.

Die Datenverarbeitung, alle mathematischen Berechnungen sowie die Programmierung erfolgten durch Dr. M. Böhmer.

Die mathematischen Details der Datenverarbeitung waren wie folgt: Die lokale Krümmung ($1/r$) wurde abgeleitet von der ersten und zweiten Ableitung einer zweidimensionalen parametrischen Kurve entsprechend der Gleichung nach Bronstein und Semendjajew (1989):

$$1/r = \dot{x}\ddot{y} - \dot{y}\ddot{x} / (\dot{x}^2 + \dot{y}^2)^{3/2}.$$

Die erste und zweite Ableitung wurden durch Konvolution mit dem symmetrischen Differenz-Operator der vierten Ordnung bestimmt (Pao, 1999). Dadurch, dass die Trajektorie aus diskreten Koordinaten rekonstruiert wurde, waren die Werte der Ableitungen verrauscht und wurden deshalb mit einem Savitzky-Golay Filter (Savitzky & Golay, 1964) geglättet.

Zur Beobachtungsfläche schwimmen die Spermien im oder gegen den Uhrzeigersinn. Daraus ergeben sich je nach Drehsinn positive oder negative Werte für die Krümmung entlang der Trajektorie. Um die Trajektorien aller Zellen miteinander vergleichen zu können, wurden die Koordinaten der Zellen, die im Gegen-Uhrzeigersinn schwimmen an der Y-Achse gespiegelt und entlang der X-Achse verschoben. So ergaben sich für alle Trajektorien nur positive Krümmungswerte. Die Krümmung änderte sich nur von positiven zu negativen Werten, wenn sich die Schwimmrichtung einer Spermienzelle während der Messung von links nach rechts änderte.

2.2.7 Stimulus-Funktion und Korrelations-Analyse

Die Spermienzellen in der Beobachtungskammer schwimmen parallel in einer Ebene entweder zum Boden oder zum Deckel der Kammer. Der Flagellenschlag ist innerhalb dieser

Ebenen eingeschränkt und verläuft ebenfalls parallel zur Oberfläche. Demnach kann die Stimulus-Funktion wie folgt definiert werden:

$$S(t) = \iint_{A_f} c(\vec{P}(t)) dA_f$$

wobei A_f die einhüllende Fläche ist, die vom Flagellum während des Schlages überstrichen wird und $c(\vec{P}(t))$ die relative Konzentration des Lockstoffes ist, die an der Position $\vec{P}(t)$ vom Flagellum wahrgenommen wird. Um die Phasenverschiebung zwischen der Stimulus-Funktion und den Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zu bestimmen, wurde die Kreuz-Korrelation zwischen der Stimulus-Funktion und den Ca^{2+} -Signalen mit der Auto-Korrelation der Stimulus-Funktion verglichen. Um die Reaktion der Stufenerhöhung in der Resackonzentration von der folgenden quasi-oszillierenden Stimulus-Funktion zu trennen, wurde der erste Ca^{2+} -Spike in der Korrelations-Analyse nicht berücksichtigt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, aus Sambrook et al. (1989) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.3.1 *E.coli*-Zellkultur

2.3.1.1 Verwendeter Bakterienstamm und Plasmidvektoren

In dieser Arbeit wurde der *E.coli* K12-Stamm XL1-Blue (Bullock et al., 1987) und BM25.8 (Palazzolo et al., 1990) mit folgenden Genotypen benutzt:

E.coli XL1-Blue:

recA1, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *lac* [F' *proAB*, *lacI^qZΔM15*, *Tn10* (Tet^r)]. Dieser Bakterienstamm wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA und zur Herstellung von „ Mg^{2+} -Zellen“ verwendet.

E.coli BM25.8:

supE44, thi Δ(lac-proAB) [F⁺ traD36, proAB⁺, lacI^qZΔM15] λ imm434 (kan^R) P1 (cam^R) hsdR (r_{k12} – m_{k12} –). Dieser Bakterienstamm wurde für die Konversion vom λTriplEx2-Bakteriophagen zum pTriplEx2-Derivat verwendet.

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmidvektoren benutzt:

pBluescript SK⁻:

(Stratagene) Dieses Plasmid wurde als Vektor für die Klonierung von rekombinanter DNA verwendet.

pBluescript SK⁻Extended (hergestellt von Dr. W. Bönigk):

Diesem Plasmid sind folgende Schnittstellen zwischen der EcoRI und der HindIII-Schnittstelle in der MCS hinzugefügt worden: SfiI (A), NdeI, NsiI, NcoI, SfiI (B). Dieses Plasmid wurde für die Sequenzierung der isolierten Klone des cDNA-Screening verwendet.

Als Vektor für die cDNA-Bibliothek diente der Bakteriophagen-Vektor λTriplEx2 (BD Biosciences).

2.3.1.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für *E.coli*

Zur Kultivierung von *E.coli* Kulturen wurden folgende Medien verwendet:

LB (Luria-Bertani)- Flüssigmedium	10 g/l Bactotrypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
2 x YT-Medium	16 g/l Bactotrypton 10 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
NZY-Topagar	10 g/l NZ-Amin 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 2 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O 7,5 g/l Agarose

LB-Agarplatten enthielten zusätzlich 15 g/l Agar. Zur Herstellung von NZY-Agarplatten wurde statt der Agarose 15 g/l Agar zugegeben.

Die Flüssigmedien wurden in Portionen aufgeteilt, autoklaviert (20 min; 121°C) und bei RT gelagert. Agar enthaltende Medien wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25-30 ml/Platte). Bei Bedarf wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) oder Tetracyclin (Endkonzentration: 12,5 µg/ml) kurz vor dem Gießen der Platten in den höchstens noch 60°C heißen Agar gegeben. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt.

Zur Farbidentifizierung von XL1-Blue-Bakterienkolonien mit rekombinanter DNA wurden auf LB-Agarplatten 50 µl X-Gal (250 mg/ml) und 25 µl IPTG (120 mg/ml) ausgestrichen.

2.3.1.3 Anzucht von *E.coli*-Bakterienkulturen

2.3.1.3.1 Anzucht von *E.coli*-Zellen zur Plasmidpräparation

E.coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden mindestens 8 h in LB-Medium bei 37°C in einem Rotationsinkubator (New Brunswick; Nörtingen) oder in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel; Melsungen) inkubiert. Zur Selektion auf Plasmide wurde das Medium mit einem geeigneten Antibiotikum (2.3.1.2) versetzt.

2.3.1.3.2 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA

Kompetente Zellen wurden nach einer modifizierten Form der CaCl₂-Methode nach Mandel & Higa (1970) hergestellt. 0,5 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur (ÜK) wurden in 50 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert (entspricht einer Bakterienkonzentration von 2×10^8 Zellen/ml) und 10 min bis 2 h auf Eis abgekühlt. Bei den folgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen immer auf Eis gehalten und ausschließlich vorgekühlte Gefäße und Lösungen verwendet.

Die Zellen wurden 10 min zentrifugiert (5.000 g, 4°C), das Pellet vorsichtig in 1 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und auf 25 ml aufgefüllt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 1 ml 0,1 M CaCl₂/25 % Glycerin resuspendiert und auf 5 ml aufgefüllt. Nach weiteren 2 h auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen auf Eis aufgetaut.

2.3.1.3.3 Herstellung von „Mg²⁺-Zellen“ zur Amplifizierung von λ -Phagen DNA

E.coli-Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose bei 37°C angezogen, pelletiert (3.000 g, 5 min, RT), anschließend in 10 mM MgSO₄ zu einer OD₆₀₀ von ca. 10 resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung (2.3.12.1) bei 4°C gelagert.

2.3.2 Plasmid-DNA-Präparationen

DNA wurde grundsätzlich in TE bzw. TE_{RNase} aufgenommen:

TE: 1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 7,6

TE_{RNase}: TE mit 4 μ l RNase-Cocktail (Ambion)/ml

2.3.2.1 Mini-Präparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)

Für die Präparation wurden die Bakterienzellen aus ca. 1 ml einer ÜK durch Zentrifugation (12.000 g, 1 min, RT) pelletiert und in 50 μ l Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 60 μ l Lösung II und vorsichtigem Mischen (Invertieren) lysieren die Zellen, wobei die chromosomale DNA an der Zellwand gebunden bleibt. Zur Präzipitation der Zelltrümmer und Proteine wurden 75 μ l Lösung III zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 bis 30 min zentrifugiert (12.000 g, RT). Der Überstand wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.3.3.1). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 550 μ l Ethanol präzipitiert und abzentrifugiert. Das Nukleinsäure-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen (12.000 g, 5 min, 4°C) und dann in 20 μ l TE aufgenommen.

War die DNA zur Sequenzierung (2.3.11) bestimmt, wurde sie zusätzlich mittels der LiCl-Plasmidpräparation gereinigt, da Verunreinigungen durch RNA die Sequenzreaktionen stören. Dazu wurden die Bakterienzellen aus einer 5 ml ÜK durch zwei Zentrifugationsschritte (12.000 g, 1 min, RT) in einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß pelletiert. Analog zur oben beschriebenen Präparation wurden die Zellen in 150 μ l Lösung I resuspendiert, durch Zugabe von 180 μ l Lösung II lysiert und Zelltrümmer und Proteine mittels 225 μ l Lösung III präzipitiert. Nach einer Zentrifugation (17.000 g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand mit 1,5 ml Ethanol versetzt und die präzipitierten Nukleinsäuren abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 60 μ l 30 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Zur Präzipitation der RNA wurden 100 μ l 4 M LiCl

zugegeben, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (17.000 g, 5 min, 4°C). Die DNA im Überstand wurde mit 500 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl TE_{RNase} aufgenommen und 10 bis 20 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit H₂O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc pH 4,8 und 300 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20 µl TE aufgenommen.

Lösung I:

50 mM Glucose

25 mM Tris/HCl pH 7,5

10 mM EDTA

Lösung II:

0,2 M NaOH

1 % SDS

Lösung III:

3 M KAc pH 4,8

2.3.2.2 Alkalische Maxi- und Mega-Präparationen

Größere DNA-Mengen wurden mittels der LiCl-Plasmidpräparation isoliert. Für eine Maxi-Präparation wurden die Bakterienzellen aus einer 250 ml ÜK pelletiert (5.000 g, 10 min, 4°C), in 20 ml Lösung I (2.3.2.1) resuspendiert und mit 24 ml Lösung II (2.3.2.1) lysiert. Proteine, chromosomale DNA und wurden durch Zugabe von 30 ml Lösung III (2.3.2.1) gefällt und pelletiert (5.000 g, 10 min, RT). Nach Filtration durch ein Faltenfilter wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, zentrifugiert (5.000 g, 10 min, 4°C) und das Nukleinsäure-Pellet in 1,45 ml H₂O und 50 µl Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl wurde die RNA gefällt und pelletiert (5.000 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 12 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (5.000 g, 15 min, 4°C) wurde das Pellet in 500 µl TE_{RNase} resuspendiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion (2.3.3.1) und Ethanol-Präzipitation (2.3.3.2) gereinigt. Das Pellet wurde getrocknet und in 250 µl TE aufgenommen.

Mega-Präparationen wurden aus 500 ml Bakterienkulturen angefertigt. Die Volumina der oben angegebenen Lösungen wurden entsprechend angepasst.

2.3.3 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.3.3.1 Phenol/Chloroformextraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen, Membranbestandteilen etc. wurden durch Phenol/Chloroformextraktion entfernt. Die DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus TE-gesättigtem Phenol und Chloroform versetzt. Die Phasen wurden gut gemischt und zur Trennung zentrifugiert (15.000 g, 3 min, RT). Die wäßrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.3.3.2).

2.3.3.2 Ethanol-Präzipitation

Um DNA zu konzentrieren oder umzupuffern, kann sie durch Einstellung definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen präzipitiert werden. Die DNA-Lösung wurde auf eine NaAc-Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit dem 2,5-3fachen Volumen Ethanol versetzt, gemischt und 5-30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (18.000 g, 30-120 min, 4°C) pelletiert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach der Menge der DNA. Je kleiner und je geringer konzentriert die DNA war, desto länger wurde zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE aufgenommen.

2.3.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.3.4.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden diese in TE verdünnt und die Absorption bei 260 nm in einer Küvette (Schichtdicke 1 cm) gegen TE gemessen. Bei der Berechnung der Konzentration wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

Doppelsträngige DNA	50 µg/ml bei OD ₂₆₀ =1
RNA	40 µg/ml bei OD ₂₆₀ =1
Oligonukleotide	33 µg/ml bei OD ₂₆₀ =1

Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurepräparationen. Bei reinen Nukleinsäurelösungen ist er $\geq 1,8$.

2.3.4.2 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen

Die Menge an DNA, die auf ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (2.3.5) aufgetragen wurde, konnte durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (2.3.5.1) anhand der Intensität der Ethidiumbromid gefärbten Banden auf einem UV-Transilluminator abgeschätzt werden.

2.3.5 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Für Trennungen im Bereich von 500-10.000 Bp wurden 0,75-1 % Agarose-Gele verwendet. Zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten wurden höher konzentrierte Agarose-Gele eingesetzt (1,5-2 %).

Die Agarose wurde in 1x TAE aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Nachdem die Gellösung auf 60°C abgekühlt war, wurde sie mit 1 µg Ethidiumbromid/ml versetzt und in einen Gelträger mit einem Former für die Probentaschen gegossen. Nach dem Erkalten der Gellösung wurden die Proben, die zuvor mit 1/10 Volumen Farbmarker versetzt worden waren, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Laufpuffer bei 90-120 V durchgeführt. Nukleinsäuren waren durch die „Anfärbung“ mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar.

TAE (50x):

2 M Tris/Acetat pH 7,5
50 mM EDTA

Farbmarker (10x):

10x TAE
50 % Glycerin
0,25 % Xylencyanol

2.3.5.1 DNA-Größen- und Mengenstandard

λ-DNA mit EcoRI/Hind III geschnitten (MBI Fermentas; Vilnius, Litauen). Fragmentgrößen: 21.226, 5.184, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564, 125 Bp. Die Konzentration betrug 67 ng/µl.

2.3.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

2.3.6.1 Elution von DNA aus Agarosegelen nach der Zentrifugationsmethode

Bei der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit der Zentrifugationsmethode (Heery et al., 1990) wurde der Deckel eines Eppendorfreaktionsgefäßes entfernt, der Boden mit einer Kanüle durchstoßen und das Reaktionsgefäß mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde auf die Glaswatte gelegt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Gefäß gesetzt und in einer Eppendor fzentrifuge zentrifugiert (7.000 g, 10 min, RT). Das Eluat enthielt das DNA-Fragment. Die Ausbeute betrug zwischen 30 % und 50 %.

2.3.7 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die Ansätze in 1x Inkubationspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. Wenn dies nicht möglich war, wurden zwischen den Inkubationen durch Zugabe der entsprechenden Salze die neuen Pufferbedingungen eingestellt, nach Ethanol-Präzipitation (2.3.3.2) umgepuffert oder das benötigte Restriktionsfragment aus einem präparativen Agarose-Gel eluiert (2.3.6). Zum Schneiden wurden 3-5 U Enzym/ μ g Plasmid-DNA eingesetzt. Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA, die durch alkalische Mini-Präparation isoliert worden war, wurden zusätzlich mit RNase-Cocktail (Ambion) versetzt.

Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 10 μ l durchgeführt und, wenn nicht anders vermerkt, nach 2 h Inkubation vollständig auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Das Volumen für präparative Ansätze betrug 20-100 μ l. Nach mindestens 60 min Inkubationszeit wurde kontrolliert, ob die DNA vollständig geschnitten war. Gegebenenfalls wurde weiteres Enzym zugegeben und wenn nötig ü.N. inkubiert. Nach der vollständigen Restriktion wurde der Ansatz auf ein präparatives Agarose-Gel aufgetragen.

2.3.8 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.3.8.1 Glätten überhängender Einzelstrang-Enden

Überhängende 5'-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt (5'→3'-Polymeraseaktivität). Durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Der Reaktionsansatz (2 U Klenow-Enzym/μg DNA, in einem beliebigen Restriktionspuffer, 100 μmol dNTP) wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 5 bis 10 min bei 68°C inaktiviert.

2.3.8.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Da PCR-Fragmente (2.3.10) keine endständigen 5'-Phosphat-Gruppen besitzen, wurden sie vor der Ligation (2.3.9.1) in Vektoren phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase (Roche) in dem mitgelieferten Puffer und 1 mM ATP 1 h bei 37°C inkubiert. Nachdem die Kinase inaktiviert wurde (10 min, 65°C) wurden die Fragmente für die Ligation eingesetzt. Im Falle einer zuvor durchgeführten Klenow-Reaktion mußten die Desoxynukleotide entweder durch Ethanol-Präzipitation (2.3.3.2) oder durch Agarose-Gelelektrophorese (2.3.5) entfernt werden.

2.3.8.3 Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren

Die glatten oder kompatiblen Enden geschnittener Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase (Roche) dephosphoryliert, um eine Religation der Enden zu vermeiden. Dazu wurden 5 μg geschnittene Vektor-DNA, 10 μl 10× Phosphatasepuffer und 2 U alkalischer Phosphatase mit H₂O auf 100 μl aufgefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl EGTA (0,5 M) und anschließender 10 minütiger Inkubation bei 68°C beendet. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.3.3.1) und anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.3.3.2) oder aus einem Agarose-Gel (2.3.6) eluiert.

10× Phosphatasepuffer:

500 mM Tris/HCl pH 8,5

1 mM EDTA

2.3.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.3.9.1 Ligation

Zur Ligation wurden ca. 50 ng geschnittener und dephosphorylierter Vektor und ein 3-5facher molarer Überschuß der DNA-Fragmente in 1x Ligasepuffer gemischt. Wiesen die Fragmente komplementäre überhängende Einzelstrang-Enden auf, wurde mit 0,5 µl einer 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) 30 min bei 22°C bzw. ü.N. bei 16°C ligiert. Wiesen die Fragmente glatte Enden auf, wurde mit 0,5 µl einer 6,2 U T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia Biotech) ü.N. bei 16°C ligiert. Das Reaktionsvolumen betrug 10-20 µl.

Ligase-Puffer (10x):

600 mM Tris/HCl pH 7,5

50 mM MgCl₂

10 mM DTE

10 mM ATP

2.3.9.2 Transformation

5-10 µl des Ligationsansatzes (2.5.3.1) wurden mit 5 µl 10x CM-Puffer (100 mM CaCl₂, 400 mM MgCl₂) versetzt, mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und auf Eis gekühlt. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen (2.3.1.3.2) gegeben, vorsichtig gemischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min bei 42°C („Hitzeimpuls“) und 10-15 min auf Eis wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Regenerationszeit, die der Ausprägung der Antibiotika-Resistenz dient, wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (100 µg Ampicillin/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

Die sogenannte "Retransformation" eignete sich, um Plasmid-DNA erneut von Bakterien amplifizieren zu lassen. Dazu wurden 0,5-1 µl Plasmid-DNA mit 30-50 µl der kompetenten Zellen versetzt und 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von LB-Medium und 20 minütiger Regenerationszeit wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert oder als Vorkultur zum Animpfen von 500 ml-Kulturen verwandt.

2.3.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente spezifischer Länge und Sequenz amplifiziert werden. In mehreren Zyklen wird die Matrizen-DNA hitzedenaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden hybridisiert und diese mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis et al., 1986). Das PCR-Fragment kann über Schnittstellen oder nach Klenow-Reaktion (2.3.8.1) und Phosphorylierung (2.3.8.2) in einen Vektor kloniert werden (2.3.9).

2.3.10.1 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide („Primer“) wurden von MWG Biotech bezogen. Die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide sind im Anhang (Abschnitt 7) aufgeführt.

2.3.10.2 Bedingungen für die PCR-Reaktionen

Die Reaktionen wurden in einem „DNA Thermal Cycler“ (Perkin Elmer) oder in einem „TRIO-Thermoblock“ (Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde je 45 sek denaturiert und hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer. Sie wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$T_m = (G/C) \times 4^\circ\text{C} + (A/T) \times 2^\circ\text{C} - (\text{Basenfehlpaarung}) \times 4^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$$

Zur Strangverlängerung wurde bei 72°C inkubiert. Die Zeitspanne richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und betrug dabei ca. 1 sek/10 B. Es wurden 25-40 Zyklen durchgeführt. Es wurden folgende Polymerasen mit dem Puffer des jeweiligen Herstellers verwendet: Taq-Polymerase (Roche) und Primezyme (Biometra; Göttingen).

Ein 100 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

- 1-10 ng Plasmid-DNA
- je 300 ng Primer
- 10 µl 10x PCR-Puffer für die jeweilige Polymerase
- 1 µl 20 mM dNTP
- 1-2,5 U hitzestabile Polymerase

2.3.10.3 Reinigung der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden durch Phenol/Chloroformextraktion (2.3.3.1) und Ethanol-Präzipitation (2.3.3.1) gereinigt. Waren Nebenprodukte vorhanden oder sollten die PCR-Produkte in Plasmidvektoren subkloniert werden, wurde die DNA auf ein Gel aufgetragen (2.3.5) und die Fragmente der gewünschten Größe wurden eluiert (2.3.6).

2.3.11 DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Die DNA-Markierung erfolgte durch eine PCR (2.3.10) mit IRD800-Fluorophor-markierten Primern. Die Fragmente wurden in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen im „LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200“ (MWG-Biotech) aufgetrennt. Zur Sequenzauswertung wurden die Software des Geräteherstellers sowie die Programme PCGene und PCSupp (Dr. W. Bönigk, IBI-1/Forschungszentrum Jülich) eingesetzt.

2.3.11.1 Sequenzierreaktion

Es wurde das „Thermo Sequenase Kit“ von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Pro kB der zu sequenzierenden DNA wurden ca. 65 ng DNA eingesetzt. Vom IRD800-Fluorophor-markierten Primer (2 pmol/μl) wurden 0,6 μl hinzugegeben. Zur Relaxation der Matrizen-DNA wurde der Ansatz mit 0,7 μl 50 % DMSO versetzt und anschließend mit H₂O auf ein Volumen von 7 μl aufgefüllt. Je 1,5 μl des Ansatzes wurde auf vier PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Je 0,75 μl der vier Terminationsmixe wurde mit dem gleichen Volumen H₂O verdünnt und zu je einem der vier 1,5 μl-Aliquots gegeben. Die Ansätze wurden mit 15-20 μl Chill-out 14 Liquid Wax (MJ Research) überschichtet und zur PCR (2.3.10) eingesetzt.

2.3.11.2 PCR zur Sequenzierung

Die Reaktionen wurden in einem "TRIO-Thermoblock" (Biometra) oder in einem „DNA Thermal Cycler“ (Perkin Elmer) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde 40 sek denaturiert. Die Hybridisierung der

Primer erfolgte bei 50°C für 40 sek. Zur Strangverlängerung wurde bei 70°C für 1 min inkubiert. Es wurden 40 Zyklen durchgeführt.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 µl Stopppuffer abgebrochen. Es wurde der Stopppuffer des Sequenzierkits (2.3.11.1) benutzt, dem Xylencyanol in einer Endkonzentration von 0,2 % zugesetzt worden war. Zur Denaturierung wurden die Ansätze 2 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. 1-1,8 µl der Proben wurden auf ein Sequenziergel (2.3.11.3) aufgetragen.

2.3.11.3 Denaturierende Polyacrylamid-Sequenziergele

Zwei 66 cm lange Glasplatten wurden gründlich mit H₂O und Ethanol gereinigt. Sie wurden durch 0,25 mm starke Abstandhalter getrennt und mit Schraubschienen zusammengedrückt. 41,6 ml einer 4,6 % Gellösung wurden im Vakuum oder durch Sonifizierung entgast und mit 350 µl 10 % APS und 50 µl TEMED versetzt. Die Gellösung wurde in eine 60 ml-Spritze gefüllt und luftblasenfrei durch einen Sterilfilter zwischen die Gelplatten gegossen. Ein "Vorformer"-Kamm wurde in das Gel gedrückt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 1 h war die Polymerisation des Acrylamids abgeschlossen. Nachdem das Gel in die Kammer eingespannt war, wurde 1x TBE eingefüllt. Die Probentaschen wurden von einem "Haifischzahn"-Kamm gebildet, der leicht in die Geloberfläche eingedrückt wurde.

Die Elektrophorese wurde mit 1x TBE als Laufpuffer bei 45 W und 45°C durchgeführt. Nach einem 45 minütigen Vorlauf wurden die Proben aufgetragen. Die Gelelektrophorese dauerte 8-10 h. Die Leseweiten betrugen zwischen 600 und 1000 Bp.

<u>10x TBE:</u>	<u>4,6 % Gellösung:</u>
1,34 M Tris	21 g Harnstoff
450 mM Borsäure	5 ml 10x TBE
25 mM EDTA	0,5 ml DMSO
pH 8,3-8,7 (bei 50°C)	5,6 ml Rapid Gel XL (USB)
	30,5 ml H ₂ O

2.3.12 Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Es wurde eine cDNA-Bibliothek aus Gonaden männlicher Seeigel der Spezies *Arbacia punctulata* mit dem SMART-cDNA Library Construction Kit (BD Biosciences) hergestellt. Ausgehend von 1 µg polyadenylierter RNA wurde die Erststrang-cDNA nach Hersteller-

Angaben synthetisiert. Die Zweitstrang-Synthese erfolgte mittels einer PCR ebenfalls nach Herstellerangaben.

Zur Größenfraktionierung wurde die cDNA über eine CHROMA SPIN-400 Säule aufgetrennt. Von den eluierten Fraktionen wurden jeweils 3 µl in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und das Gel fotografiert. Die Fraktionen die cDNA-Fragmente enthielten wurden vereinigt und Ethanol-präzipitiert (2.3.3.2). Die Inkubations-Bedingungen der Reaktionsschritte zur Konstruktion der cDNA-Bibliothek sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Reaktion	Enzym	Inkubationsbedingungen	Inkubation
Erststrangsynthese	100 U PowerScript-Reverse Transkriptase (BD Biosciences)	Erststrangsynthesepuffer ⁽¹⁾ (BD Biosciences), 1 µg RNA, 1 µM SMART IV Oligonukleotide (BD Biosciences), 1 µM CDS III/3'-Primer (BD Biosciences), 1 mM dNTP, 2 mM DTT Reaktionsvolumen: 10 µl	1 h bei 42 °C
Zweitstrangsynthese	2,2 µg Advantage 2 PCR Polymerase Mix	Advantage 2 PCR Puffer ⁽²⁾ (BD Biosciences), 0,2 µM CDS III/3'-Primer, 0,2 µM 5'-Primer (BD Biosciences) 0,2 mM dNTP Reaktionsvolumen: 100 µl	PCR 20 Zyklen
Proteinase K-Verdau	40 µg Proteinase K (BD Biosciences)	Zweitstrangsyntheseansatz plus Enzym; Nach Inkubation: Phenol/Chloroform Extraktion.	20 min bei 45 °C
Sfi I-Verdau	200 U Sfi I Enzym (BD Biosciences)	Sfi-Restriktionspuffer ⁽³⁾ (BD Biosciences), 1 x BSA Reaktionsvolumen: 100 µl	2 h bei 50 °C
Vektorligation	100 U T4-DNA Ligase (BD Biosciences)	Ligasepuffer ⁽⁴⁾ (BD Biosciences), 1,5 µl cDNA des Restriktionsansatzes, 500 ng λTriPLEX2 (BD Biosciences) 1 mM ATP Reaktionsvolumen: 5 µl	ü.N. bei 16°C

⁽¹⁾ [50 mM Tris/HCl, 75 mM KCl, 6 mM MgCl₂, pH 8,3]

⁽²⁾ [40 mM Tricine-KOH, 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 µg/ml BSA, 0,005 % Tween 20, 0,005 % Nonidet-P40]

⁽³⁾ [50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0]

⁽⁴⁾ [50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,05 mg/ml BSA, pH 7,6]

SMART IV Oligonukleotide: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'

CDS III/3'-Primer: 5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)₃₀N₁N-3'

(N = A, G, C or T; N₁ = A, G or C)

5'-Primer: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

Der Ligationsansatz wurde anschließend mit dem „Gigapack III gold Kit“ (Stratagene) nach dem Protokoll des Herstellers verpackt.

2.3.12.1 Titerbestimmung einer cDNA-Bibliothek

Verschiedene Verdünnungen der Phagensuspension wurden mit 50 µl Mg^{2+} -Zellen (2.3.1.3.3) 20 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien-Phagen-Mischungen wurden mit je 5 ml NZY-Topagar (auf 48°C vorgewärmt) versetzt und auf NZY-Agarplatten (Ø 86 mm) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C bis zur Lyse der Bakterien (9-14 h) inkubiert. Anhand der gebildeten Plaques wurde der Gesamttiter bestimmt. Für die Oligo-dT-geprimte cDNA-Bibliothek aus Hoden von *A. punctulata* wurde ein Titer von 5×10^5 Phagen ermittelt.

2.3.12.2 Amplifizierung einer cDNA-Bibliothek

Zur Amplifizierung der cDNA-Bibliothek wurde die Bakterien-Phagen-Mischung mit einem Titer von ca. 50.000 pro Platte (Ø145 mm) ausplattiert. Zur Elution der λ -Phagen wurden die Agarplatten mit jeweils 10 ml SM-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,01 % Gelantine) überschichtet und ü.N. unter leichtem Schütteln bei 4°C inkubiert. Der SM-Puffer wurde abgenommen und die Agarplatten nochmals mit je 2 ml SM-Puffer nachgespült. Die vereinigten SM-Phasen wurden zur Abtrennung von Agar- und Zellresten zentrifugiert (5 min, 4.000 g, RT). Der Überstand wurde abgenommen, mit 10 % Chloroform (v/v) versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Ein Teil der amplifizierten cDNA-Bibliothek wurde mit 7 % DMSO (v/v) versetzt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.12.3 Ausplattieren von λ -Phagen

Die cDNA-Bibliothek wurde wie unter 2.9.1 beschrieben ausplattiert. In der nachfolgenden Tabelle sind die Zahl der Plaque-bildenden Einheiten, das verwendete Volumen an Mg^{2+} -Zellen, sowie die Größe der verwendeten NZY-Agarplatten für die erste Hybridisierungsrunde (Grobscreen) und die nachfolgenden Vereinzelungsrunden (Feinscreen) aufgeführt:

Hybridisierungsschritt	Mg ²⁺ -Zellen (OD ₆₀₀ =10)	NZY-Topagar	Plaque-bildende Einheiten	NZY-Plattengröße
Grobscreen	300 µl	10 ml	30.000-50.000	Ø 145 mm
Feinscreen	50 µl	5 ml	30-200	Ø 86 mm

Die weiteren Arbeitsschritte zur Identifizierung spezifischer Klone (Plaquelifting, Immobilisierung auf Nylonmembranen, Hybridisierung mit radioaktiven Sonden und Autoradiographie) werden unter 2.3.13 beschrieben.

2.3.12.4 Isolierung von λ-Phagen

Nach der Autoradiographie in den Hybridisierungsrunden wurden die Signale auf dem Röntgenfilm den entsprechenden λ-Phagen-Plaques auf den Agarplatten zugeordnet. Die entsprechenden Regionen wurden mit Pasteurpipetten ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer eluiert. Zur Vereinzelung wurden die eluierten, Plaque-bildenden Einheiten erneut ausplattiert (2.3.12.3, Feinscreen). In der Regel wurden ein bis zwei Vereinzelungsrunden durchgeführt. Rekombinante pTriplEX2-Plasmide wurden nach Herstellerangaben (BD Biosciences) durch „in vivo excision“ aus der DNA vereinzelter λ-TriplEX2-Phagen isoliert.

2.3.13 Nachweis spezifischer Nukleinsäuren

2.3.13.1 Radioaktive Markierung spezifischer Sonden

Nukleinsäuren wurden durch spezifische DNA-Sonden nachgewiesen, die mit der *random priming* Methode (Feinberg & Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert worden waren. Die Markierung wurde mit dem „Megaprime DNA Labelling Kit“ (Amersham) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Radionuklid diente [α -³²P]-dCTP (spezifische Aktivität > 6.000 Ci/mM; Amersham). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration (Sephadex G75; Pharmacia) abgetrennt. Die Markierungseffizienz wurde in einem Szintillationszähler (Tricarb 200 CA, Packard) bestimmt.

2.3.13.2 Transfer und Immobilisierung von λ -Phagen DNA

Die Phagen-DNA wurde von Agarplatten nach Benton und Davis (1977) durch „Plaquelifting“ auf Nylonmembranen (Pall) überführt. Die Orientierung der Filter auf den Agarplatten wurde durch Einstiche durch die Filter in den Agar markiert. Die Filter wurden nach 5 min von den Platten abgezogen, 5 min denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und anschließend 10 min neutralisiert (0,5 M Tris/HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5). Die Nukleinsäuren wurden auf den Nylonmembranen in einem Stratalinker (Stratagene) unter UV-Licht (254 nm, 0,12 J/cm²) immobilisiert.

2.3.13.3 Hybridisierung von immobilisierter λ -Phagen DNA mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden

Die Bedingungen für die Hybridisierung immobilisierter Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten DNA-Sonden sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

	Hybridisierung	
Stringenz	niedrig: 52°C	hoch: 65°C
Prähybridisierung	5 x SSC ⁽¹⁾ , 5 x Denhardt's ⁽²⁾ , 0,1 % SDS, 100 µg Heringssperma-DNA 1-2 h	5 x SSC ⁽¹⁾ , 5 x Denhardt's ⁽²⁾ , 0,1 % SDS, 100 µg Heringssperma-DNA 1-2 h
Hybridisierung	Prähybridisierungslösung mit 50-100 ng ³² P-markierter DNA (1 x 10 ⁶ cpm/ml) 12-14 h	Prähybridisierungslösung mit 50-100 ng ³² P-markierter DNA (1 x 10 ⁶ cpm/ml) 12-14 h
Waschen	2 x SSC ⁽¹⁾ , 0,1 % SDS 2 x 30 min 55°C	1 x SSC ⁽¹⁾ , 0,1 % SDS 2 x 30 min 65°C

⁽¹⁾1 x SSC 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,5

⁽²⁾1 x Denhardt's Ficoll 400, Polyvinylpyrrolidon, Rinderserum-Albumin (je 0,2 g/l)

Spezifische Hybride, die aus Nukleinsäuren und radioaktiv markierten DNA-Sonden bestanden, wurden ü.N. bei -80°C unter Verwendung von Verstärkerfolie (Cronex Hi plus, Du Pont) autoradiographisch nachgewiesen (Diagnostic-Röntgenfilm XAR5; Kodak).

2.3.13.4 Transfer und Immobilisierung von DNA auf Nylonmembran (*Southern Blot*)

Der Transfer von DNA auf Membranen wurde nach Meinkoth und Wahl (1984) durchgeführt. Nach der Restriktion wurde die DNA in einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.3.5). Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 10 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), danach für 10 min in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl pH 7,5) inkubiert. Durch Diffusion wurde die DNA mit 20 x SSC (0,3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat pH 7,0) in 4-12 h auf eine Nylonmembran (PALL) übertragen. Die Immobilisierung der DNA erfolgte in einem Stratalinker (Stratagene, Heidelberg) durch UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$, $0,12 \text{ J/cm}^2$).

2.3.13.5 Hybridisierung von immobilisierter DNA mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden

Die Hybridisierung der immobilisierten DNA auf der Nylonmembran wurde bei 55°C durchgeführt. Die Southern Blots wurden für 60 min in einer Prähybridisierungs-Lösung (5 x SSC, 5 x Denhardt's, 0,1 % SDS, 100 μg Heringssperma-DNA) inkubiert. Die radioaktiv-markierten Sonden (10^6 cpm/ml) wurden mit 5ml Prähybridisierungslösung aufgefüllt. Diese Hybridisierungs-Lösung wurde über Nacht bei 55°C mit dem *Southern Blot* inkubiert. Nach der Hybridisierungsreaktion wurden die Membranen mit Waschpuffer (1 x SSC, 0,1 % SDS) zweimal 30 min bei 55°C gewaschen. Spezifische Hybride wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Belichtung der Röntgenfilme (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgte für 5-7 Tage unter Verwendung von Verstärkerfolien (Cronex Hi plus, Du Pont) bei -80°C .

2.3.14. Präparation gesamtgenomischer DNA aus *dry sperm*

Für die Präparation gesamtgenomischer DNA aus Seeigel-Sperma wurde ca. 200 µl *dry sperm* in 2 ml Lysepuffer (200 mM NaCl, 100 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7,4) homogenisiert und SDS bis zu einer Endkonzentration von 1 % hinzugeben. Das Homogenisat wurde mit Lysepuffer auf 5 ml aufgefüllt und mit 0,2 mg/ml Proteinkinase K über Nacht bei 37° inkubiert. Die Lösung wurde zentrifugiert (Sigma 2K15, 18.000 x g, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde dreimal mit Phenol/Chloroform und zweimal mit Chloroform extrahiert. Die Lösung wurde mit 3 Volumen Ethanol überschichtet. Die an der Phasengrenze ausfallende DNA wurde mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette aufgewickelt, in 70%igen Ethanol gewaschen und in TE gelöst.

3 Ergebnisse

Das Zusammentreffen von Spermium und Eizelle wird durch chemische Faktoren vermittelt, die von der Eizelle stammen. Diese Faktoren steuern das Schwimmverhalten der Spermien in der Nähe der Eizelle und bewirken eine gerichtete Bewegung des Spermiums zur Eizelle hin. Diese gerichtete Bewegung in einem chemischen Gradienten wird als Chemotaxis bezeichnet. In dieser Arbeit sollte das chemotaktische Schwimmverhalten von Spermien mariner Invertebraten analysiert werden. Es sollten die Zusammenhänge zwischen der Peptid-induzierten Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Änderung des Schwimmverhaltens in einzelnen, schwimmenden Spermien untersucht werden. Desweiteren sollte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden das Gen, das für einen CNG-Kanal kodiert aus einer *A. punctulata* Hoden-cDNA Bibliothek kloniert werden.

Das Kapitel „Ergebnisse“ gliedert sich in drei Teile. Der erste Teil beschreibt die Untersuchungen des Schwimmverhaltens im Dunkelfeldmikroskop von 1. Spermien des Seeigels *A. punctulata* und 2. von Spermien des Seesterns *A. amurensis*. Der zweite Teil umfasst die Untersuchungen zur Beobachtung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in einzelnen, schwimmenden Spermien im Laser-Fluoreszenz Mikroskop. Der dritte Teil befasst sich mit den molekularbiologischen Untersuchungen zur Klonierung eines Kanalprotein-Gens aus einer *A. punctulata* Hoden-cDNA-Bibliothek.

3.1 Untersuchungen des Schwimmverhaltens von Spermien im Dunkelfeldmikroskop

3.1.1 Schwimmverhalten von Spermien des Seeigels *A. punctulata* und des Seesterns *A. amurensis*

In einer flachen Beobachtungskammer schwimmen unstimulierte Spermien sowohl des Seeigels *A. punctulata* als auch des Seesterns *A. amurensis* in Kreisen parallel zur Glasoberfläche. Dieses Schwimmen im Kreis wird als Normalverhalten angesehen (Ward et al., 1985; Miller, 1985; Cook et al., 1994; Kaupp et al., 2003). Die Kreise haben bei den Seeigeln einen mittleren Durchmesser von $56 \mu\text{m} \pm 13 \mu\text{m}$ (Kaupp et al., 2003) und $81,3 \mu\text{m} \pm 14,8 \mu\text{m}$ ($n = 15$) bei den Seesternen. Die Spermien halten sich bevorzugt an den zwei Grenzflächen Glas/Wasser parallel zur Oberfläche der Kammer auf. Wenn die Spermien uneingeschränkt in einem dreidimensionalen Raum schwimmen könnten, würde die Trajektorie einer dreidimensionalen Spirale entsprechen (Crenshaw, 1989). Durch die Begrenzung durch den Boden und den Deckel der Beobachtungskammer schwimmen die Spermien in Kreisen parallel zu den Begrenzungsflächen (Gray, 1955). Die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit unstimulierter Seeigel-Spermien beträgt $197 \pm 59 \mu\text{m s}^{-1}$ ($n = 8$) und die der Seestern-Spermien $334 \pm 86 \mu\text{m s}^{-1}$ ($n = 14$).

3.1.2 Schwimmverhalten von *A. punctulata* Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP

Resact induziert einen cGMP-aktivierten Ca^{2+} -Einstrom, der wiederum zu einer Verhaltensänderung führen soll. Durch die gezielte intrazelluläre Freisetzung von cGMP sollte die Wirkung dieses Botenstoffes auf das Schwimmverhalten von Spermien näher charakterisiert werden. Für die Untersuchungen sowohl an Seeigel- als auch Seestern-Spermien im Dunkelfeldmikroskop wurde das DEACM-*caged*-cGMP verwendet. Spermien, die mit DEACM-*caged*-cGMP inkubiert wurden, zeigten schon nach einer Inkubationszeit von 45 min deutliche Reaktionen nach Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. Wenn Spermien mit BECMCM-*caged*-cGMP inkubiert wurden, waren selbst nach einer Inkubationszeit von 2 h kaum erkennbare Reaktionen nach einem UV-Blitz zu sehen. Da die BECMCM-*caged* bzw. die BCMCM-*caged* Verbindungen eine niedrigere Quantenausbeute im Vergleich zu den DEACM-*caged* Verbindungen besitzen (siehe Material und Methoden, Tab. 2.1), ist vermutlich die Blitzlampe im Aufbau des Dunkelfeldmikroskops nicht

ausreichend stark, um genügend cGMP aus BCMCM-*caged*-cGMP freizusetzen. Ein Nachteil, der sich bei Verwendung von DEACM-*caged*-cGMP ergibt, ist, dass durch die Verdünnung der Spermien im Versuchsansatz die *caged*-Verbindung mit der Zeit dem Konzentrationsgefälle folgend aus der Zelle diffundiert. Für die Versuchsdurchführung bedeutete das, dass an einem Versuchsansatz nur eine möglichst kurze Zeit (5-10 min) gemessen wurde, um jedes Mal ungefähr gleiche Mengen an cGMP mit einem UV-Blitz freizusetzen. In den folgenden Experimenten wurden *A. punctulata* Spermien mit 50 μM DEACM-*caged*-cGMP inkubiert.

Um eine Verhaltensänderung nach einer Stimulation detektieren und analysieren zu können, wurde die lokale Krümmung entlang der Schwimmtrajektorie als Parameter eingeführt. Die Krümmung wurde definiert als der inverse Radius ($1/r$ in μm^{-1}) eines Tangential-Kreises, der an jedem Punkt der Trajektorie angelegt wird (siehe Material & Methoden 2.2.6).

Wurden die Spermien aus dem Inkubationsansatz (siehe Material & Methoden 2.2.4) $1:10^4$ - $1:10^5$ verdünnt und unter dem Mikroskop betrachtet, schwammen die Spermien zunächst in Kreisen, d.h. sie zeigten das Normalverhalten (siehe 3.1.1). Nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP verließen die Spermien ihre Kreise und schwammen scheinbar ziellos (siehe Diskussion) im gesamten Gesichtsfeld des Mikroskops umher. Während der gesamten Aufnahmezeit von 30-45 s blieb nur ein geringer Anteil der zuvor beobachteten Spermien im Gesichtsfeld. Die gesamte Trajektorie (30 s) eines Spermiums nach cGMP-Freisetzung ist in Abb. 3.1 A dargestellt. Die Trajektorie ist gekennzeichnet von Bereichen, in denen das Spermium eine scharfe Kurve oder Biegung schwimmt („turn“) und von Bereichen in denen das Spermium geradliniger schwimmt („run“). Diese zwei Verhaltensmuster wiederholten sich abwechselnd, wobei die Bereiche des geraden Schwimmens bzw. des Kurven-Schwimmens unterschiedlich lang bzw. stark ausgeprägt sind. Nach durchschnittlich $6,8 \text{ s} \pm 1,8 \text{ s}$ ($n = 16$) kehrten die stimulierten Spermien zum Normalverhalten zurück. Die Rückkehr zum Normalverhalten wird darauf zurückgeführt, dass vermutlich freigesetztes cGMP durch die Aktivität einer Phosphodiesterase (Kaupp et al., 2003) abgebaut wird. Auch könnten andere adaptive Prozesse dafür verantwortlich sein. Zunächst hatten die Kreise des wieder aufgenommenen Normalverhaltens einen größeren Durchmesser als die Kreise vor der Stimulation. Mit der Zeit wurden die Kreise graduell kleiner, bis der Durchmesser der Kreise den Wert vor der Stimulation erreicht hatte. Alle diese Änderungen des Schwimmverhaltens spiegelten sich in der Änderung der Krümmung der Schwimmtrajektorie wider (Abb. 3.1 B). Die Bereiche, in denen das Spermium eine Kurve schwamm, waren durch eine hohe Krümmung und die Bereiche, in denen das Spermium geradliniger schwamm, durch eine

niedrige Krümmung charakterisiert. Kurz nach Stimulation durch den UV-Blitz verließ das Spermium seine Kreisbahn durch eine starke Biegung bzw. „turn“. Dieser „turn“ zeigte sich durch eine steile Erhöhung der Krümmung. Danach fiel die Krümmung auf Werte, die unter den Werten vor der Stimulation lagen, d.h. die Trajektorie wurde geradliniger und die Zelle schwamm einen „run“. Das „turn and run“-Verhalten in der Trajektorie erzeugte ein spezifisches Krümmungsmuster. Dieses Krümmungsmuster, ein Maximum in der Krümmung gefolgt von einer starken Abnahme der Krümmung, wiederholte sich mehrere Male während einer Messung. Die durchschnittliche Dauer dieser „turn and run“-Abschnitte in diesen Experimenten betrug $6,4 \pm 3,1$ s ($n = 16$). Danach näherte sich die Krümmung wieder langsam den Werten vor der Stimulation an. Das langsame Angleichen der Werte der Krümmung repräsentiert den Übergang von größeren zu kleineren Kreisen in der Schwimmtrajektorie.

Zusammengefasst besteht die Änderung des Schwimmverhaltens nach Stimulation mit cGMP aus zwei Komponenten, die anhand der Änderung der Krümmung beschrieben werden können: 1. eine *langsame tonische* Komponente in Form einer Abnahme der Krümmung unter „pre-stimulus“ Werte und einer folgenden langsamen Angleichung der Krümmung an die pre-stimulus Werte. 2. Eine *phasisch-dynamische* Komponente in Form der mehrfachen Wiederholung eines Krümmungsmusters, die der tonischen Komponente überlagert ist. Das Krümmungsmuster besteht aus einer schnellen Zunahme der Krümmung bis zu einem Maximum, gefolgt von einer starken Abnahme der Krümmung. Diese Änderungen in der Krümmung wurden durch eine Biegung und einem darauffolgendem Bereich geradlinigen Schwimmens in der Trajektorie („turn and run“) hervorgerufen.

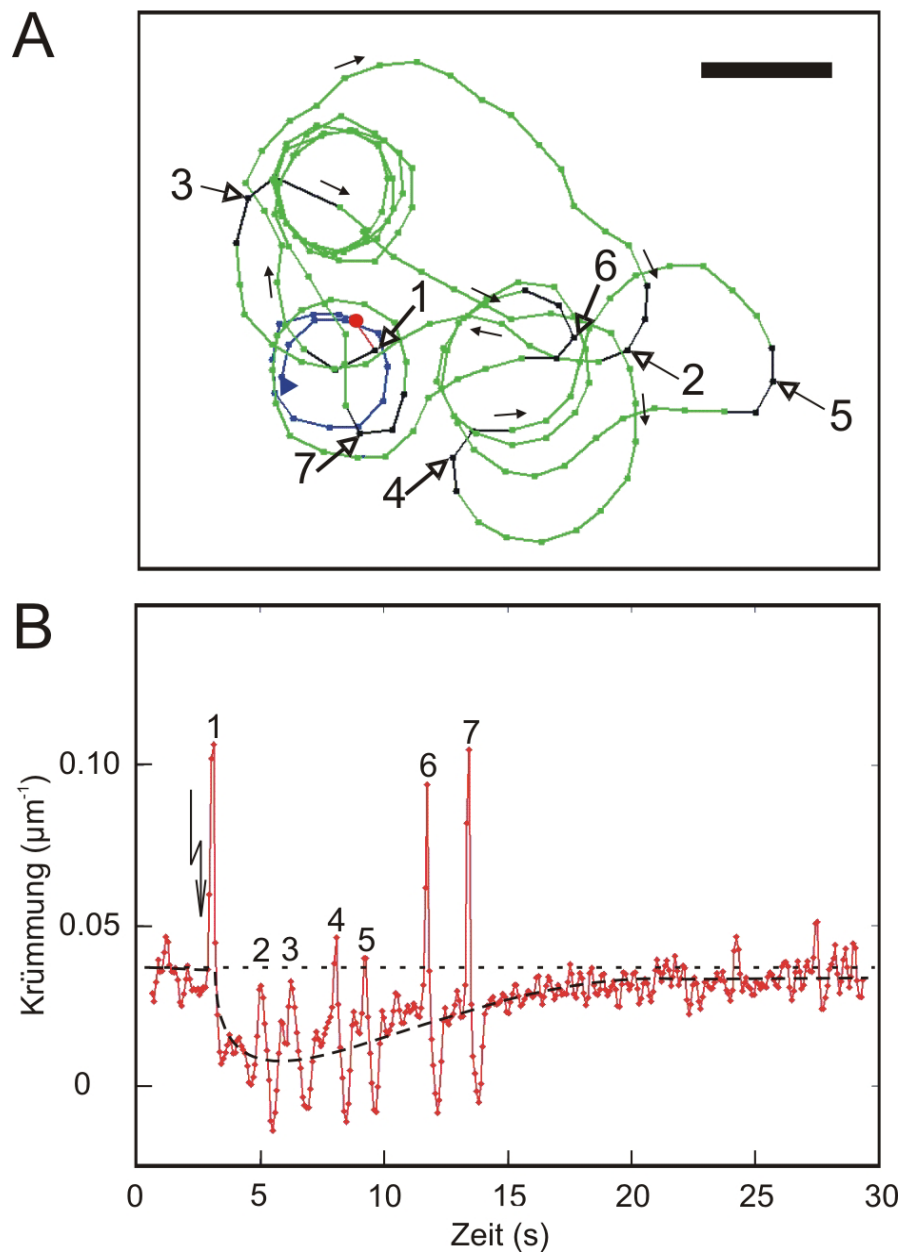


Abbildung 3.1: Änderung des Schwimmverhaltens einer Spermienzelle von *A. punctulata* nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. **(A)** Schwimmtrajektorie eines Spermiums vor (blaue Linien) und nach (grüne Linien) der intrazellulären Freisetzung von cGMP (rote Linie). Die blaue Pfeilspitze kennzeichnet den Start der Trajektorie. Kleine schwarze Pfeile zeigen die Schwimmrichtung an. Die Bereiche der Trajektorie, in denen das Spermium eine Biegung schwimmt sind in schwarz hervorgehoben und an Pfeilen nummeriert. Das Intervall zwischen jedem Koordinatenpunkt beträgt 80 ms. Der schwarze Balken entspricht 50 μm. **(B)** Änderung der lokalen Krümmung ($1/r$) entlang der Trajektorie nach Stimulation mit cGMP. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt des UV-Blitzes. Die Zahlen kennzeichnen die Peaks in der Krümmung und die entsprechenden Bereiche der Trajektorie in (A). Die schwarz-gestrichelte Linie kennzeichnet die tonische Komponente in Form der Abnahme und der folgenden langsamen Angleichung an die pre-stimulus Werte der Krümmung.

Wurden Spermien in Ca^{2+} -freiem ASW verdünnt (ionische Zusammensetzung wie ASW ohne Zugabe von CaCl_2 und mit 11 mM EGTA) und cGMP intrazellulär freigesetzt, so wurde die phasisch-dynamische Komponente des Krümmungsverlaufs vollkommen unterdrückt (Abb. 3.2). Lediglich die tonische Abnahme der Krümmung blieb davon unberührt, d.h. die Kreise weiteten sich nach der Stimulation mit cGMP (Abb. 3.2. Kasten). Dieses Ergebnis zeigt, dass die phasisch-dynamische Komponente Ca^{2+} abhängig ist.

Des Weiteren wurden die Änderungen des Schwimmverhaltens durch die Stimulation von cGMP von einer Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit (Chemokinesis) begleitet. Die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit vor Stimulation mit cGMP betrug $197 \pm 59 \mu\text{m s}^{-1}$ und $284 \pm 105 \mu\text{m s}^{-1}$ ($n = 8$) (durchschnittliche relative Erhöhung 1,44; Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,01$) nach Stimulation. Die Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit durch Freisetzung von cGMP in Ca^{2+} -freiem ASW zeigt, dass Chemokinesis getrennt von Chemotaxis auftreten kann. Dieses Experiment zeigt auch, dass cGMP neben der Funktion als Botenstoff im chemotaktischen Signalweg diesen chemokinetischen Effekt bewirkt. Der ähnliche Zeitverlauf der zwei Prozesse, die Zunahme der Geschwindigkeit und die tonische Abnahme der Krümmung, lässt vermuten, dass die Aufweitung der Kreise durch die Geschwindigkeitszunahme verursacht wird. Dieser Zusammenhang kann durch die Anwendung der einfachen kinematischen Relation $1/r = \omega/v$ (wobei ω die Kreisfrequenz und v die Geschwindigkeit ist), die eine kreisförmige Bewegung beschreibt, bestätigt werden. Die durch eine Geschwindigkeitszunahme berechnete Abnahme der Krümmung ist nahezu deckungsgleich mit dem experimentell bestimmten Krümmungsverlauf (Abb.3.2).

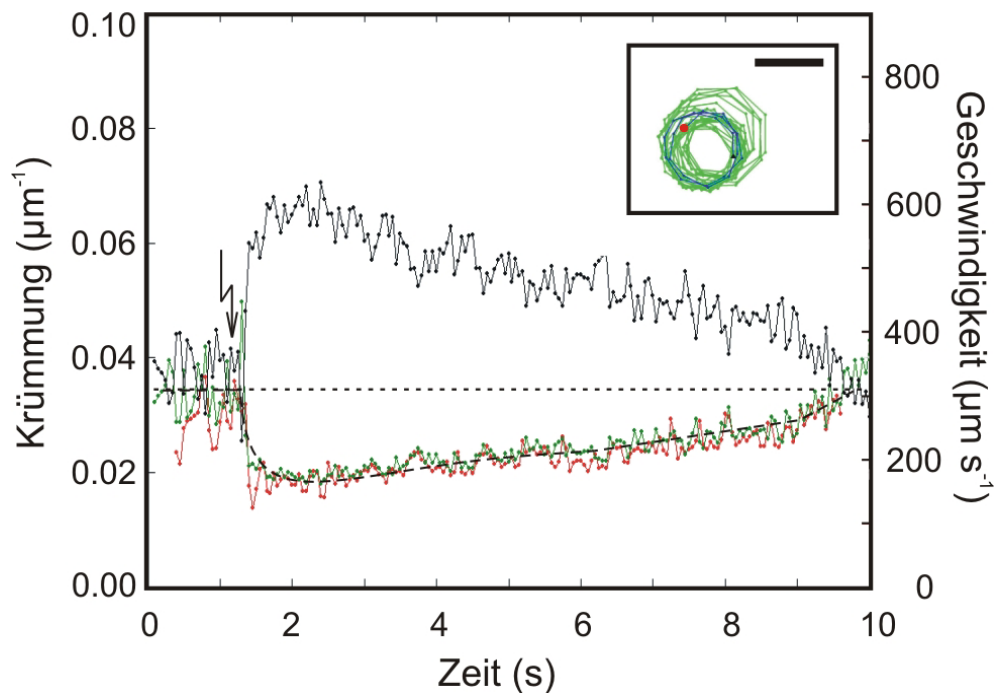


Abbildung 3.2: Schwimmverhalten einer *A. punctulata* Spermienzelle in Ca^{2+} -freiem ASW nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP. Der Verlauf der Krümmung ist in rot dargestellt. Die Zunahme der Geschwindigkeit ist in schwarz dargestellt. Die schwarz gestrichelte Linie kennzeichnet die tonische Abnahme der Krümmung. Die berechnete Abnahme der Krümmung durch eine Zunahme der Geschwindigkeit ist in grün dargestellt. Inset: Trajektorie vor (blau) und nach (grün) dem UV-Blitz (roter Punkt). Der schwarze Balken entspricht 50 μm .

3.1.3 Schwimmverhalten von *A. punctulata* Spermien in einem Resact-Gradienten

Das chemotaktische Schwimmverhalten von Spermien, d.h. das Schwimmen in einem Lockstoff-Gradienten, wurde in keiner der bisher veröffentlichten Arbeiten näher untersucht. Die Schwierigkeit bestand darin, zu einem definierten Zeitpunkt einen Lockstoff-Gradienten zu erzeugen, auf den die Spermien reagieren. Durch die Verwendung von *caged Resact* konnte durch Photolyse in der Objektebene des Mikroskops Resact gezielt freigesetzt werden und das chemotaktische Verhalten aufgezeichnet und analysiert werden.

Zunächst wurde die Wirksamkeit der Freisetzung von Resact aus *caged Resact* auf schwimmende Spermien in „Akkumulations-Experimenten“ getestet (Abb. 3.3). Hierzu wurden Spermien in ASW verdünnt, das 1 μM *caged Resact* enthielt. In der Mitte des Gesichtsfelds wurde Resact durch einen räumlich begrenzten UV-Blitz (400 ms) freigesetzt. Die Spermien akkumulierten innerhalb weniger Sekunden im Bereich der belichteten Fläche. Diese „Akkumulations-Experimente“ zeigen, dass es unter Verwendung von *caged Resact*

möglich ist, einen Gradienten in der Objektebene des Mikroskops zu erzeugen, um damit das chemotaktische Schwimmverhalten von Spermien in diesem Gradienten zu untersuchen.

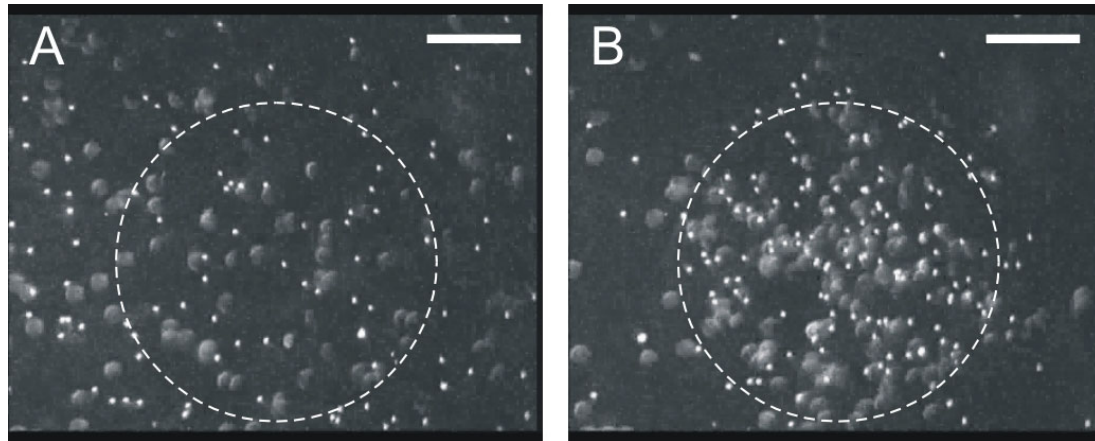


Abbildung 3.3: Akkumulation von *A. punctulata* Spermien nach Freisetzung von Resact durch einen UV-Blitz. (A) Verteilung der Spermien vor Freisetzung von Resact. **(B)** Akkumulation der Spermien 10 s nach der Freisetzung von Resact durch einen UV-Blitz (400 ms). Die durch den Blitz belichtete Fläche ist als gestrichelter Kreis dargestellt. Die weißen Balken entsprechen 100 µm.

Da *caged Resact* noch eine geringe Wirksamkeit auf Spermien besitzt (siehe Material und Methoden 2.1.1.2) wurde für die Gradienten-Experimente, in denen das chemotaktische Verhalten näher untersucht wurde, eine Konzentration eingesetzt, auf welche die Spermien noch reagierten, die aber möglichst niedrig war. Dadurch sollten adaptive Prozesse, die durch die „Hintergrund-Konzentration“ von *caged Resact* hervorgerufen wurden, möglichst vermieden werden. Es wurde eine Konzentration von 50 nM *caged Resact* eingesetzt, was einer „Hintergrund-Konzentration“ von ca. 17 pM entspricht. *Caged Resact* wurde in einem kleinen Bereich der Objektebene durch UV-Bestrahlung freigesetzt. Durch Diffusion wurde ein Gradient im Gesichtsfeld erzeugt, wobei in der Mitte der belichteten Fläche die höchste Resact-Konzentration vorherrschte. Das chemotaktische Verhalten von drei Spermien ist in Abb. 3.4 dargestellt. Während der Freisetzung von Resact durch die UV-Belichtung schwammen die Spermien zunächst noch weiter in Kreisen. Erst wenn durch die Diffusion Resact-Moleküle zu den Spermien gelangten, reagierten die Spermien und verließen ihre Kreisbahn. Das Spermium Nr. 1, das am nächsten zur belichteten Fläche schwamm, reagierte zuerst und danach jeweils die nächstgelegenen (Spermium Nr. 2 und 3). Die Spermien näherten sich der vermeintlichen Lockstoff-Quelle in versetzten Kreisen oder auch in epizykloiden Bewegungen, d.h. in Kreisen deren Mittelpunkt auf einer gekrümmten oder

mäandrierenden Linie zur Quelle verläuft. Dieses Verhalten ist charakteristisch für Spermien verschiedener Spezies (Miller, 1985). Die epizykloiden Muster in der Trajektorie zeichneten sich durch Bereiche mit hoher und niedriger Krümmung aus, ähnlich wie nach der Freisetzung von cGMP. Der Unterschied zu den cGMP-Experimenten bestand darin, dass die Maxima in der Krümmung kleiner sind und in unregelmäßigeren Abständen erschienen (Vergleich Abb.3.1 B und 3.4 B). Im Verlauf der Krümmung ist auch hier die langsame Komponente in Form einer Abnahme und einer langsamen teilweisen Angleichung zu pre-stimulus Werten zu erkennen (Abb.3.3 B), d.h. die Kreise wurden größer, wenn die Spermien sich der Quelle näherten und verkleinerten sich anschließend wieder, bis sie den normalen Radius erreicht hatten. Die Rückkehr zum Normalverhalten während einer anhaltenden Stimulation mit dem Lockstoff setzt die Aktivierung von Adaptations-Mechanismen in der Zelle voraus.

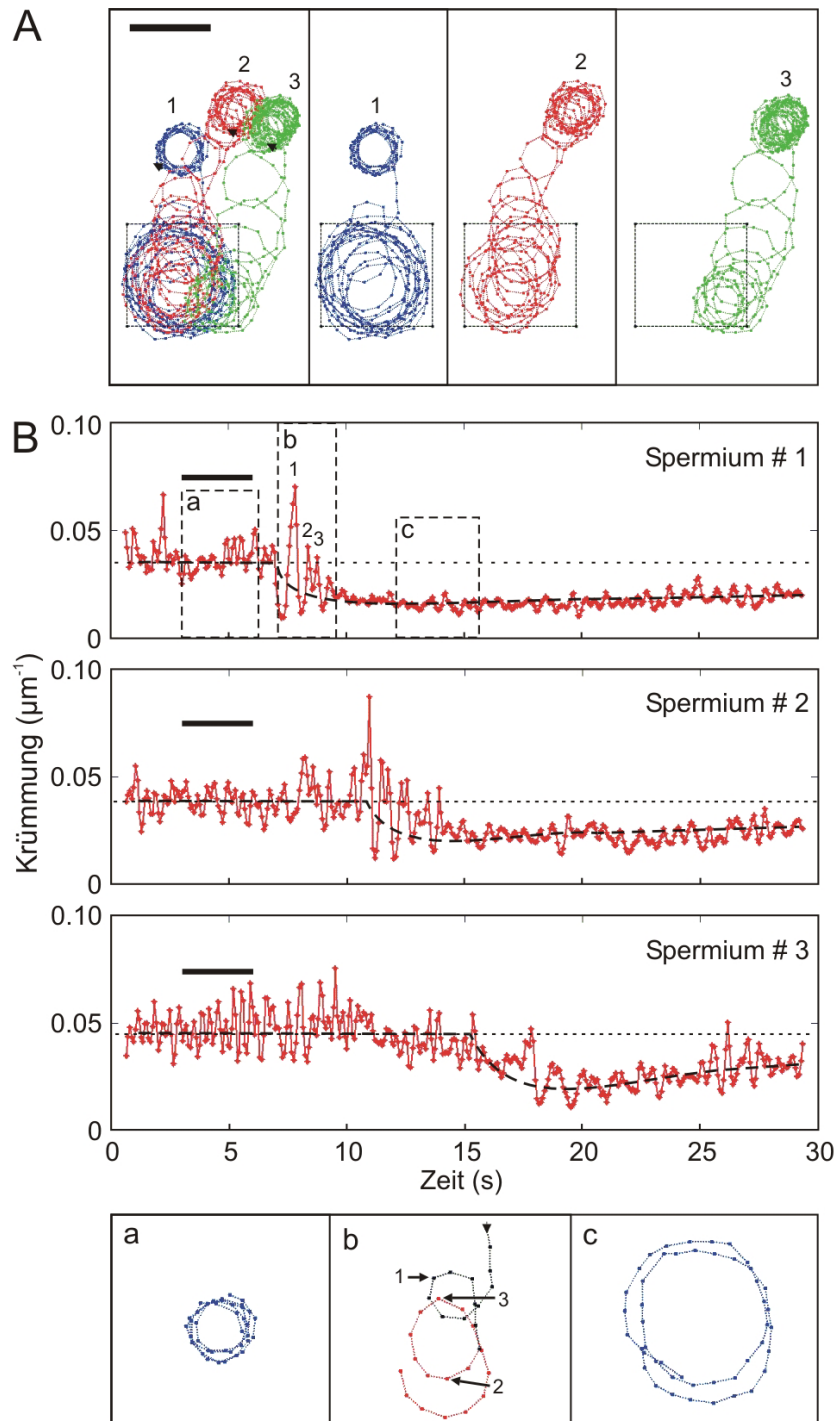


Abbildung 3.4: Schwimmverhalten von *A. punctulata* Spermien in einem Resact-Gradienten. (A) Trajektorien von drei Spermienzellen in einem Resact-Gradienten. Der Gradient in der Objektebene wurde durch eine lokale UV-Belichtung einer Fläche (Quadrat) und anschließender Diffusion erzeugt. Die Spermien wurden in ASW verdünnt, das 50 nM caged Resact enthielt. Der Balken entspricht 100 μm . **(B)** Änderung der lokalen Krümmung entlang der Trajektorien aus (A). Die Balken geben die Dauer der UV-Belichtung an. Die schwarzgestrichelte Linie kennzeichnet die tonische Abnahme der Krümmung. In den Kästen a-c ist die segmentierte Trajektorie von Spermium Nr.1 in dem gekennzeichneten Zeitbereich der Krümmung abgebildet. Die Zahlen an der Trajektorie im Kasten b beziehen sich auf die entsprechend nummerierten Maxima im Verlauf der Krümmung des Spermium Nr. 1.

3.1.4 Schwimmverhalten von *A. amurensis* Spermien nach Stimulation mit Asterosap

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass Asterosap, ein Eizellpeptid des Seesterns *A. amurensis*, an eine Rezeptor-Guanylyl-Zyklase bindet und einen cGMP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom auslöst (Matsumoto et al., 2003). Die Funktion von Asterosap ist bis heute noch unklar. In hohen Konzentrationen (1 μM) dient Asterosap als Kofaktor für die akrosomale Exozytose (Nishigaki et al., 1996). In picomolaren Konzentrationen löst Asterosap einen Ca^{2+} -Einstrom aus, der vergleichbar war mit dem Resact-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in Spermien des Seeigels *A. punctulata* (Kaupp et al., 2003; Matsumoto et al., 2003; Solzin et al., 2004).

Um herauszufinden, ob Asterosap ein chemotaktisch-aktives Peptid ist, wurden „Kapillar-Experimente“ durchgeführt. Dazu wurde ein Asterosap-Gradient erzeugt, indem eine 1 μM Asterosap-Lösung mit einer Microliter-Spritze durch eine Kapillare in die Beobachtungskammer zu den Spermien injiziert wurde. Der Gradient bildete sich dann durch Diffusion aus, wobei die höchste Asterosap-Konzentration sich an der Spitze der Kapillaröffnung befand. Unstimulierte Spermien von *A. amurensis* zeigten unter dem Mikroskop, wie *A. punctulata* Spermien, ihr Normalverhalten (siehe 3.1.1). Nach der Injektion von Asterosap (0,1 - 0,3 μl) in die Beobachtungskammer akkumulierten die Spermien vor der Öffnung der Kapillare (Abb.3.5). In den meisten Experimenten war eine deutliche Akkumulation bereits innerhalb von 20 s zu erkennen. Um die Akkumulation statistisch zu erfassen, wurde in 16 Experimenten die Anzahl der Spermien innerhalb einer bestimmten Fläche an der Kapillaröffnung vor und nach der Injektion bestimmt. Die durchschnittliche Anzahl von Spermien in einer bestimmten Fläche vor der Kapillaröffnung betrug $6,8 \pm 4,0$ vor der Injektion und $14,5 \pm 6,9$ nach der Injektion, d.h. es kam zu einer 2,1-fachen Erhöhung der Spermindichte.

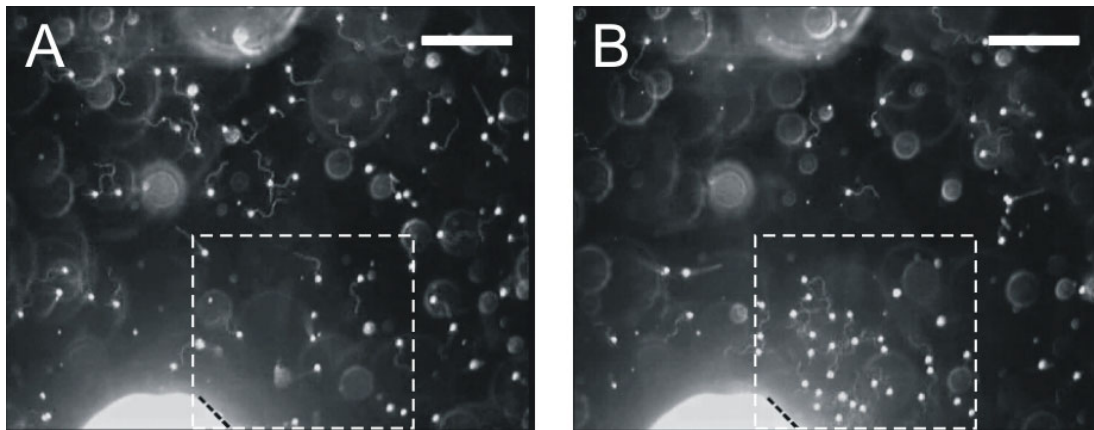


Abbildung 3.5: Akkumulation von *A. amurensis* Spermien nach der Injektion von Asterosap. (A) Verteilung der Spermien vor der Injektion von Asterosap. **(B)** Akkumulation der Spermien vor der Kapillaröffnung (schwarze, gestrichelte Linie) 17 s nach der Injektion von 1 μ M Asterosap aus der Kapillare. Anzahl der Spermien in der Fläche des Quadrates: $n = 12$, vor der Injektion; $n = 33$, nach der Injektion. Die weißen Balken entsprechen 100 μ m.

Die Spermien näherten sich der Kapillaröffnung in epizykloiden Bewegungen (Abb. 3.6). Die Trajektorien waren charakterisiert durch Bereiche mit hoher und niedriger Krümmung. Der Verlauf der Krümmung zeigte eine tonische Abnahme mit überlagerten Peaks. Die Trajektorien der Spermien konnten nur bis zu einem gewissen Zeitpunkt digitalisiert werden, da durch die hohe Spermiedichte an der Kapillaröffnung die Koordinaten der einzelnen Spermien nicht mehr eindeutig unterscheidbar waren. Die langsame Angleichung der Krümmung zurück zu pre-stimulus Werten ist deshalb in diesen Messungen nicht erfasst worden. Die tonische Abnahme der Krümmung zeigt, dass die Kreise der Spermien größer werden wenn sie sich im Gradienten zu höheren Asterosap-Konzentrationen bewegen. In Anwesenheit von IBMX, einem Phosphodiesterase-Inhibitor (Kaupp et al., 2003), und Asterosap schwimmen *A. amurensis* Spermien in engen Kreisen oder/ und „taumeln“ und zeigen somit die gleichen Reaktionen wie *A. punctulata* Spermien (mündliche Mitteilung von Prof. Dr. Hildebrand). Das Verhalten von *A. amurensis* Spermien gleicht demnach in allen untersuchten Aspekten dem Verhalten von Spermien des Seeigels *A. punctulata*. Diese Ergebnisse identifizieren Asterosap als chemotaktisch-aktives Peptid.

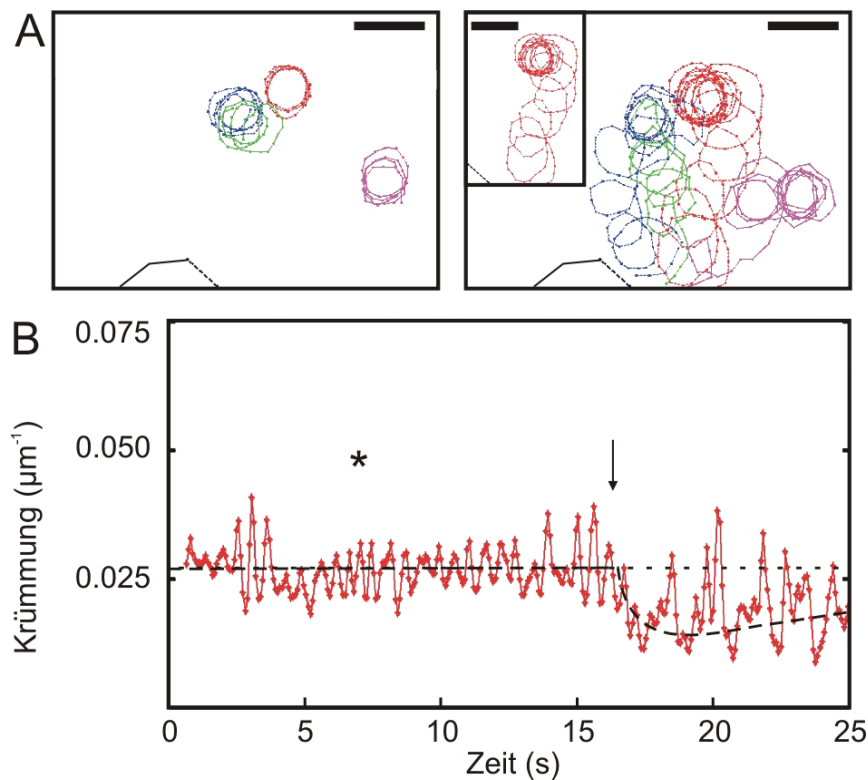


Abbildung 3.6: Schwimmverhalten von *A. amurensis* Spermien in einem Asterosap-Gradienten. (A) Trajektorien von vier Spermien vor (links) und nach (rechts) der Injektion von Asterosap aus einer Kapillare (schwarze Linie). Die Trajektorie eines Spermiums ist rechts im kleinen Kasten noch mal einzeln dargestellt. Die schwarzen Balken entsprechen 100 μm . **(B)** Änderung der lokalen Krümmung entlang der im Kasten in (A) dargestellten Trajektorie. Der Stern kennzeichnet den Zeitpunkt der Asterosap-Injektion. Der Pfeil deutet auf den Zeitpunkt der tonischen Abnahme der Krümmung unter die pre-stimulus Werte.

3.1.5 Schwimmverhalten von *A. amurensis* Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP

Asterosap aktiviert in *A. amurensis* Spermien einen cGMP-Signalweg. Durch die gezielte intrazelluläre Freisetzung sollte die Wirkung von cGMP auf das Schwimmverhalten von *A. amurensis* Spermien untersucht werden. In Experimenten mit *A. amurensis* Spermien wurden die Spermien mit 100 μM DEACM-*caged*-cGMP inkubiert. Nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP zeigten *A. amurensis* Spermien ein ähnliches Verhalten wie *A. punctulata* Spermien (Abb.3.4). Die Schwimmtrajektorie war gekennzeichnet von Bereichen mit geraden Schwimmbahnen und Bereichen mit ausgeprägten „turns“. Der Verlauf der Krümmung lässt sich beschreiben wie bei *A. punctulata* Spermien: Nach der intrazellulären Freisetzung von cGMP kommt es zu einer tonischen Abnahme der Krümmung gefolgt von einer langsamen Angleichung der Krümmung an pre-stimulus Werte. Die tonische

Komponente wurde von einer phasisch-dynamischen Komponente in Form der mehrfachen Wiederholung des Krümmungsmusters („turn and run“-Verhalten) überlagert. Im Vergleich zu den Gradienten-Experimenten waren, wie bei *A. punctulata* Spermien, in den cGMP-Experimenten die Maxima in der Krümmung größer und kamen in regelmäßigeren Abständen vor (Vergleich Abb. 3.6 und 3.7).

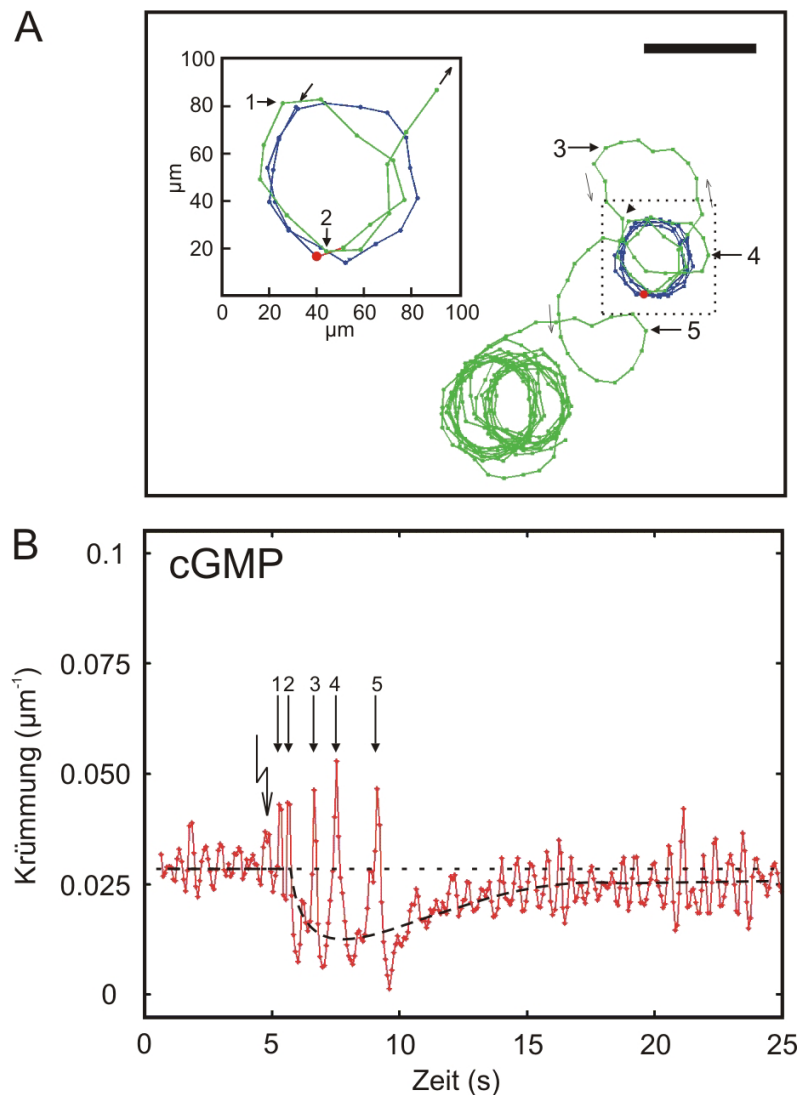


Abbildung 3.7: Änderung des Schwimmverhaltens einer Spermienzelle von *A. amurensis* nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. **(A)** Schwimmtrajektorie eines Spermiums vor (blaue Linien) und nach (grüne Linien) der intrazellulären Freisetzung von cGMP (rote Linie). Der Kasten zeigt eine Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs (Quadrat) der Trajektorie. Die kleinen schwarzen Pfeile zeigen die Schwimmrichtung an. Das Intervall zwischen jedem Koordinatenpunkt beträgt 80 ms. Der schwarze Balken entspricht 100 µm. **(B)** Änderung der lokalen Krümmung entlang der in (A) dargestellten Trajektorie. Der Pfeil deutet den Zeitpunkt des UV-Blitzes an. Die Zahlen kennzeichnen die Maxima in der Krümmung und die entsprechenden Bereiche der Trajektorie. Die schwarz-gestrichelte Linie kennzeichnet die tonische Komponente in Form der Abnahme und der späteren langsamen Angleichung an die pre-stimulus Werte der Krümmung.

Unter gleichen experimentellen Bedingungen wurde durch cAMP keine Verhaltensänderung ausgelöst (Abb. 3.8). Sowohl der Durchmesser als auch die Form der Kreise blieben nach intrazellulärer Freisetzung von cAMP unverändert. Der Verlauf der Krümmung zeigte keinerlei Unterschied gegenüber dem „Rauschpegel“ der Daten. Das „Rauschen“ der Krümmungswerte entstand bei der Bestimmung der Koordinaten einerseits durch das große CCD-Pixelraster des Kamera-Chips bei der Digitalisierung und andererseits durch die „Rollbewegung“ des Spermienkopfes (Gray, 1955). Nur nach langer Inkubationszeit (4 h) mit *caged*-cAMP waren nach einem UV-Blitz erkennbare Reaktionen zu detektieren (mündliche Mitteilung von Prof. Dr. Hildebrand). Diese Ergebnisse zeigen, dass cGMP der Botenstoff im Signalweg der Chemotaxis von Seestern-Spermien ist. In Verbindung mit den Ergebnissen aus 3.1.4 ist zu erkennen, dass die Lockstoff- bzw. cGMP-induzierten Verhaltensänderungen in Seeigel- und Seestern-Spermien in allen Aspekten vergleichbar sind.

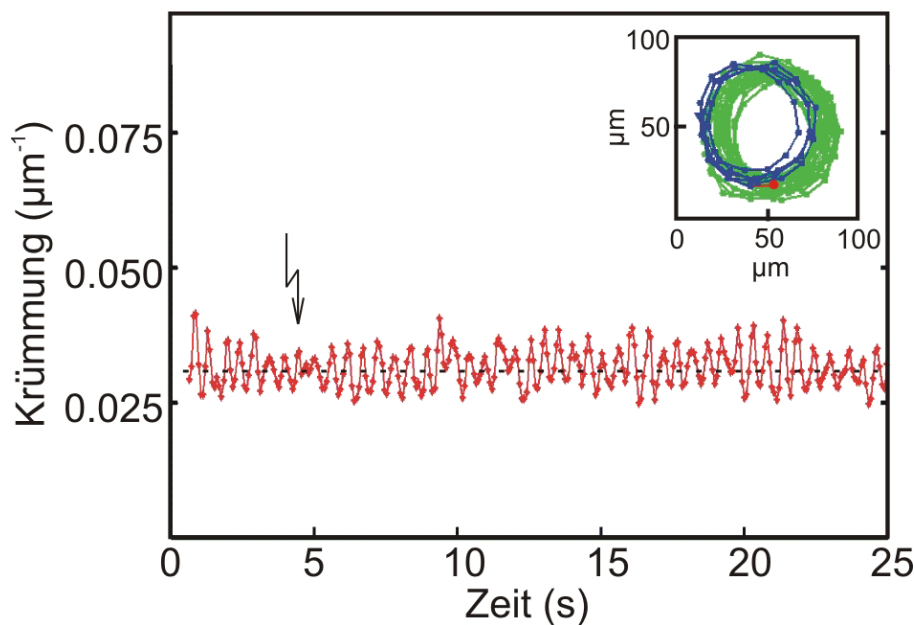


Abbildung 3.8: Schwimmverhalten einer Spermienzelle von *A. amurensis* nach intrazellulärer Freisetzung von cAMP durch einen UV-Blitz. Verlauf der lokalen Krümmung nach der intrazellulären Freisetzung von cAMP. Der Pfeil deutet den Zeitpunkt des UV-Blitzes an. Im Kasten ist die Schwimmtrajektorie vor (blau) und nach (grün) dem UV-Blitz (rot) dargestellt.

3.2 Beobachtung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in schwimmenden Spermien

3.2.1 Ca^{2+} -Dynamik in *A. punctulata* Spermien nach Freisetzung von cGMP

Um zu untersuchen, ob die Änderungen im Schwimmverhalten durch den Resact bzw. cGMP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom hervorgerufen werden, wurde die Dynamik der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in schwimmenden Spermien nach Stimulation mit Resact und cGMP beobachtet. Die Hypothese sollte geprüft werden, ob eine erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu einem „turn“ in der Trajektorie und eine erniedrigte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu einem geradlinigen Schwimmen der Spermien führt. Zu diesem Zweck wurden die Spermien mit dem fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikator Fluo-4 und *caged*-cGMP beladen. Für die Messungen der Dynamik der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde das BECMCM-*caged*-cGMP verwendet. Die Leistung der Blitzlampe im Aufbau des Fluoreszenzmikroskops reichte aus, um erkennbare Reaktionen durch einen UV-Blitz nach einer einstündigen Inkubation mit BECMCM-*caged*-cGMP hervorzurufen. Sowohl die Schwimmtrajektorie als auch die Änderung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden simultan nach der Freisetzung von cGMP aufgezeichnet. Die Fluoreszenzsignale einer Spermienzelle entlang der Schwimmtrajektorie vor und nach der Stimulation mit cGMP sind in Abb. 3.9 A dargestellt. In unstimulierten Spermien ist der Kopf während der gesamten Messung sichtbar. Die Fluoreszenz im Kopf stammte wahrscheinlich von dem Ca^{2+} -gefüllten Akrosom und den Mitochondrien des Spermiums. Das Flagellum unstimulierter Spermien war nicht fluoreszent und damit nicht sichtbar. Die Freisetzung von cGMP löste diskrete Ca^{2+} -Erhöhungen (Ca^{2+} -Spikes) im Flagellum des Spermiums aus. Dadurch war das Flagellum zeitweilig sichtbar. Die Bereiche der Trajektorie, wo ein Ca^{2+} -Einstrom erfolgte, waren gekennzeichnet durch ein Maximum in der Krümmung. Bei der zeitlichen Überlagerung der Ca^{2+} -Spikes mit den Maxima in der Krümmung (3.9 B) ist zu erkennen, dass ein Ca^{2+} -Spike einem Maximum in der Krümmung und somit einem „turn“ in der Trajektorie vorausgeht. Das Ergebnis zeigt, dass Spermien nach einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine neue Schwimmrichtung einschlagen.

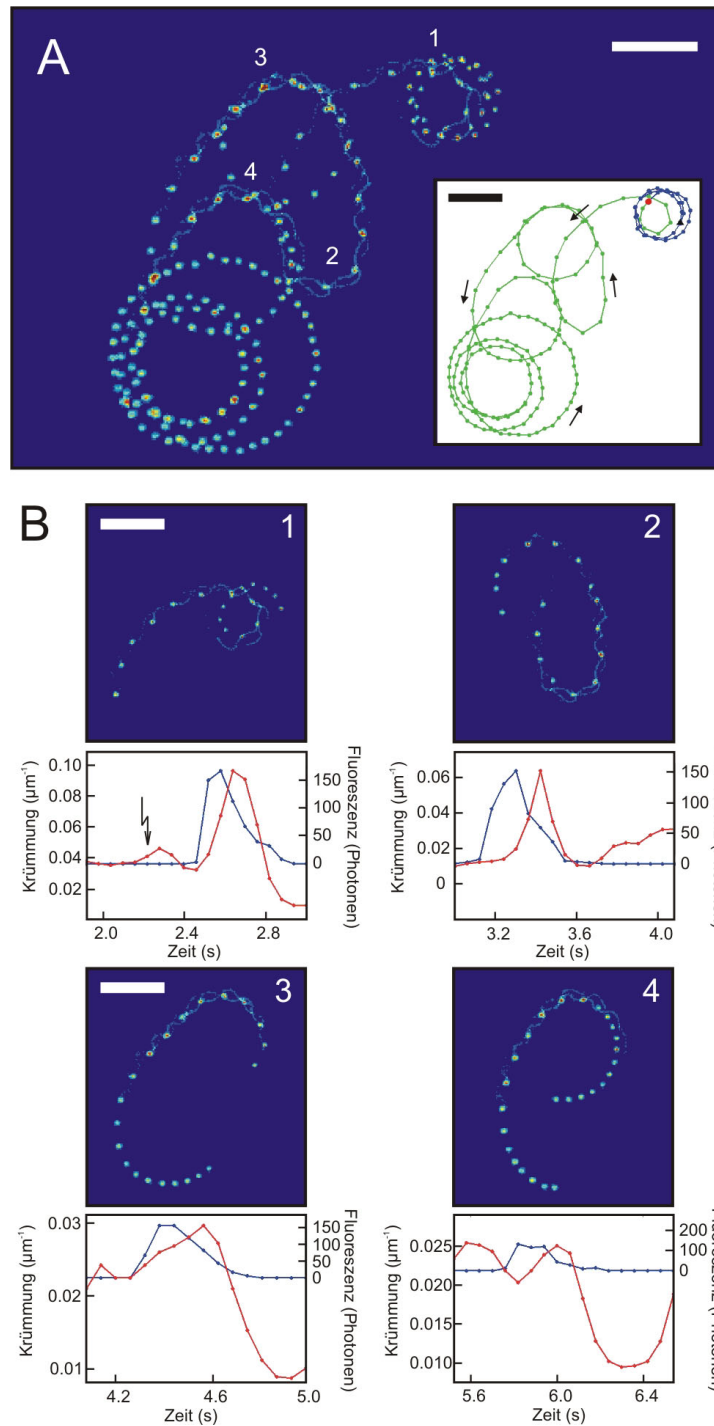


Abbildung 3.9: Ca^{2+} -Dynamik in schwimmenden *A. punctulata* Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. (A) Ca^{2+} -Fluoreszenz Signale einer Spermienzelle entlang der Schwimmtrajektorie nach Stimulation mit cGMP. Der Kasten zeigt die Trajektorie vor (blaue Linien) und nach (grüne Linien) dem UV-Blitz (roter Punkt). Die schwarzen Pfeile geben die Schwimmrichtung an. Die Hintergrundfarbe kennzeichnet eine lineare Skala der Fluoreszenz-Intensität; dunkelblau: null Photonen/Pixel; rot: 450 Photonen/Pixel. **(B)** Änderungen der Fluoreszenz und in der Krümmung vor, während und nach den vier nummerierten Biegungen in der Trajektorie aus (A). Die Änderungen der Fluoreszenz sind in blau und die der Krümmung in rot dargestellt. Zu beachten ist die unterschiedliche Größenskalierung der Ordinaten. Das Intervall zwischen jedem Datenpunkt beträgt 60 ms. Die Balken entsprechen 50 μm .

Die Änderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ des Flagellums traten als eine Folge von asymmetrischen Spikes auf, die folgende Eigenschaften hatten: Die Verzögerungszeit für den ersten Ca^{2+} -Spike nach Freisetzung von cGMP war $0,23 \pm 0,06$ s ($n = 8$) (Tab. 3.1). Diese Zeit stimmt gut mit der Verzögerungszeit der Ca^{2+} -Antwort überein, die in Spermiesuspensionen gemessen wurde (Kaupp et al., 2003). Die Zeit bis zum Erreichen des Maximums eines Ca^{2+} -Spikes (ca. 60-120 ms) war kürzer als die Abklingzeit eines Spikes (Abb.3.9 B und Abb. 3.10 A). Die Halbwerts-Breite eines Ca^{2+} -Spikes betrug $0,4 \pm 0,1$ s ($n = 8$) (Tab. 3.1). Die kurze Dauer eines Ca^{2+} -Spikes setzt das Vorhandensein eines schnellen Mechanismus voraus, der intrazelluläres Ca^{2+} in dieser kurzen Zeit aus der Zelle befördert. Vermutlich handelt es sich dabei um einen im Flagellum lokalisierten Na^+/Ca^{2+} - K^+ -Austauscher (Su & Vacquier, 2002). Die cGMP-induzierten Ca^{2+} -Spikes glichen sich weitgehend in ihrer Form. Die durchschnittliche Dauer einer Folge von Ca^{2+} -Spikes betrug $6,6 \pm 2,6$ s ($n = 8$) (Tab. 3.1). Diese Zeit stimmt gut überein mit der durchschnittlichen Dauer der „turn and run“-Abschnitte von $4,9 \pm 1,4$ s ($n = 7$) (Tab. 3.2), die in diesen Experimenten bestimmt wurde. Zwischen den Ca^{2+} -Spikes fiel die $[Ca^{2+}]_i$ wieder bis unter die Nachweisgrenze, d.h. in dieser Zeit war keine Fluoreszenz zu sehen. Da die Krümmung nach einem Ca^{2+} -Spike unter die Werte von unstimulierten Spermien fällt, ist es denkbar, dass die $[Ca^{2+}]_i$ nach einem Spike auch unter die intrazelluläre Ca^{2+} -Ruhekonzentration fällt.

Tabelle 3.1: Quantitative Eigenschaften der Ca^{2+} -Antwort im Flagellum von *A. punctulata* Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP aus BECMCM-caged-cGMP¹.

Spermium- Nummer	Anzahl der Ca^{2+} -Spikes	Dauer der Folge der Ca^{2+} -Spikes (s)	Frequenz der Ca^{2+} - Spikes (Hz)	Verzögerungszeit des ersten Ca^{2+} -Spikes nach cGMP Freisetzung (s)	Amplitude der Ca^{2+} spikes (Photonen)	Halbwerts-Breite der Ca^{2+} spikes (s)
1	8	5.9	0.8	0.18	38 ± 14	0.43 ± 0.15
2	13	9.8	0.9	0.18	186 ± 59	0.45 ± 0.16
3	4	4.0	1.6	0.30	161 ± 18	0.29 ± 0.06
4	5	4.5	1.8	0.30	502 ± 50	0.30 ± 0.04
5	5	3.4	1.8	0.24	522 ± 221	0.31 ± 0.10
6	9	9.4	0.8	0.18	166 ± 23	0.56 ± 0.13
7	8	6.0	1.5	0.18	170 ± 12	0.40 ± 0.06
8	7	9.4	1.2	0.30	160 ± 22	0.55 ± 0.10
Mittelwert	7.4 ± 2.9	6.6 ± 2.6	1.3 ± 0.4	0.23 ± 0.06	238 ± 175	0.41 ± 0.11

¹Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

Tabelle 3.2: Quantitative Eigenschaften der Verhaltensantwort von *A. punctulata* Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP aus BECMCM-*caged*-cGMP¹.

Spermium- Nummer	Anzahl der Peaks in der Krümmung	Dauer der Verhaltensantwort ("turn and run"- Abschnitte) (s)	Frequenz der Peaks in der Krümmung (Hz)	Geschwindigkeit vor der Stimulation ($\mu\text{m s}^{-1}$)	Geschwindigkeit nach der Stimulation ($\mu\text{m s}^{-1}$)
1	8	6.2	0.7	119 $\pm$ 15	115 $\pm$ 9
2	13	5.3	1.3	261 $\pm$ 11	460 $\pm$ 75
3	2	7.0	1.6	159 $\pm$ 7	294 $\pm$ 75
4	5	3.9	1.5	289 $\pm$ 18	393 $\pm$ 125
5	5	2.8	2.2	221 $\pm$ 9	252 $\pm$ 41
6	9	4.6	1.2	148 $\pm$ 16	290 $\pm$ 41
7	8	4.6	2.7	168 $\pm$ 10	237 $\pm$ 56
8	7	-	1.3	210 $\pm$ 14	231 $\pm$ 34
Mittelwert	7.1 $\pm$ 3.3	4.9 $\pm$ 1.4	1.6 $\pm$ 0.6	197 $\pm$ 59	284 $\pm$ 105

¹Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. Die mittlere Geschwindigkeit wurde aus 10 Datenpunkten bestimmt, was einer Zeit von 500 ms entspricht.

Bei niedriger extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration ($\leq 10^{-7}$ M) werden nach Stimulation mit cGMP keine Ca^{2+} -Spikes ausgelöst. Dieses Experiment bestätigt die Ergebnisse der Experimente in Ca^{2+} -freien ASW (siehe 3.1.2, Abb. 3.2): der chemokinetische Effekt wird von cGMP ausgelöst und ist, anders als die Chemotaxis, Ca^{2+} -unabhängig.

Im Vergleich zu den in Abb. 3.10 A abgebildeten Ca^{2+} -Spikes war in manchen Zellen das Muster der cGMP-induzierten Ca^{2+} -Spikes im Flagellum komplexer. Zum Beispiel fehlte manchmal ein Ca^{2+} -Spike in einer Folge von regelmäßig auftretenden Spikes, manche Spikes überlappten sich oder unterschieden sich in ihrer Größe (Abb. 3.11). Aber selbst in diesen Ausnahmen spiegelten sich die Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Krümmung der Trajektorie wider und die Anzahl der Ca^{2+} -Spikes, unabhängig von ihrer Größe, korrelierte mit der Anzahl der Peaks in der Krümmung (Tab. 3.1 und 3.2).

Nach der Hypothese sollte eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu einem „turn“ in der Trajektorie führen und ein geradliniges Schwimmen bei erniedrigter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auftreten. Aus den Abbildungen (Abb. 3.9 B und 3.11) ist zu erkennen, dass während die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ noch über der Ca^{2+} -Ruhekonzentration war, die Krümmung bereits Werte annahm die unter den Werten unstimulierter Spermien lag, d.h. die Spermien schwammen in einer geradlinigeren Trajektorie, obwohl die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ noch erhöht war. Daraus lässt sich schließen, dass eher eine *relative Änderung* der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als die *absolute Änderung* der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Krümmung der

Trajektorie bestimmt. Es wird daher angenommen, dass cGMP zwei unterschiedliche, aufeinanderfolgende Prozesse auslöst, die zu einer kombinierten Verhaltensantwort führen: 1. Eine Ca^{2+} -kontrollierte Erhöhung der Asymmetrie des Flagellenschlags, die zu einem „turn“ oder Biegung führt und 2. ein entgegengerichteter Prozess, der ein mehr geradliniges Schwimmen der Spermien verursacht. Diese Verhaltensantwort zeigte sich bereits als „turn and run“-Muster im Verlauf der Krümmung in den Experimenten unter dem Dunkelfeld-Mikroskop (Abschnitt 3.1.2). Obwohl ein Zusammenhang zwischen der Linearisierung der Trajektorie nach einem „turn“ und der Abklingphase eines Ca^{2+} -Spikes zu bestehen scheint, haben auch andere Faktoren wie z.B. die Geschwindigkeit eine Auswirkung auf die Trajektorie (siehe Abb.3.2).

Die Ca^{2+} -Spikes im Flagellum waren begleitet von Ca^{2+} -Änderungen im Kopf des Spermiums (Abb. 3.10 B). Die relativen Ca^{2+} -Änderungen im Kopf waren jedoch bis zu 100-mal kleiner als die im Flagellum. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des Kopfes änderte sich ohne erkennbare Änderungen in der Schwimmtrajektorie. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des Kopfes das Schwimmverhalten kontrollieren. Der Beginn der Ca^{2+} -Erhöhung im Flagellum ging der Ca^{2+} -Erhöhung im Kopf um ein oder zwei Messpunkte (60-120 ms) voraus. Gelegentlich änderte sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Kopf ohne eine entsprechende Änderung im Flagellum. Die Ca^{2+} -Änderungen im Kopf bestanden aus zwei Komponenten: 1. einer tonischen Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ überlagert von 2. kleinen Ca^{2+} -Fluktuationen. Solche Änderungen im $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden auch in Köpfen von immobilisierten Spermien von *S. purpuratus* beobachtet, mit dem Unterschied, dass die relativen Ca^{2+} -Änderungen im Kopf von *S. purpuratus* Spermien größer als die im Flagellum waren (Wood et al., 2003).

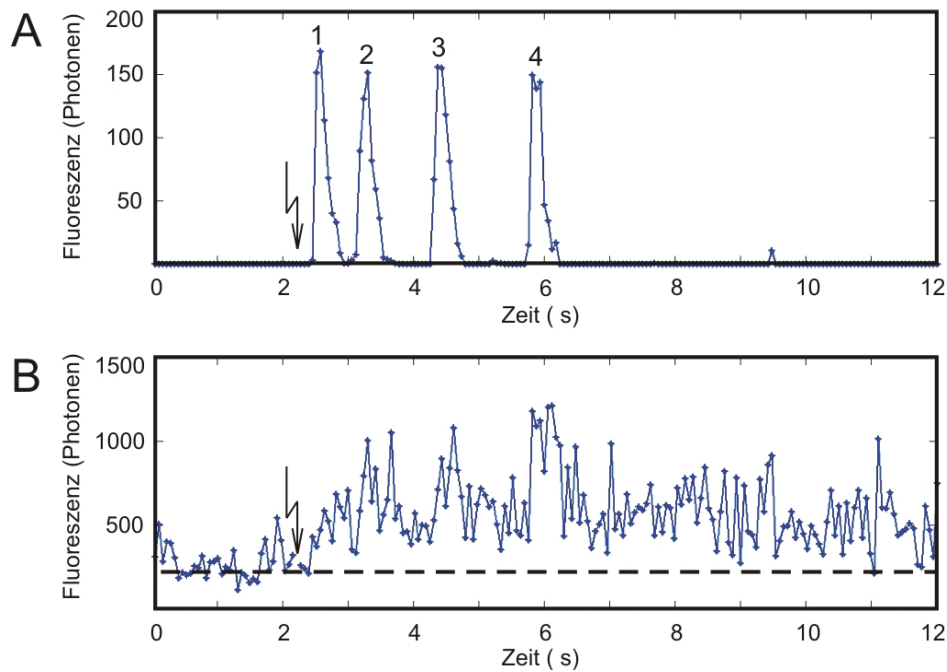


Abbildung 3.10: Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ der *A. punctulata* Spermienzelle aus Abb. 3.8 nach Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. **(A)** Ca^{2+} -Spikes im Flagellum. Die Nummern kennzeichnen die Ca^{2+} -Spikes der entsprechenden Biegungen in der Trajektorie aus Abb. 3.8. **(B)** Ca^{2+} -Dynamik im Kopf. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt des UV-Blitzes. Zum Zeitpunkt des Blitzes war eine Messung der Fluoreszenz nicht möglich.

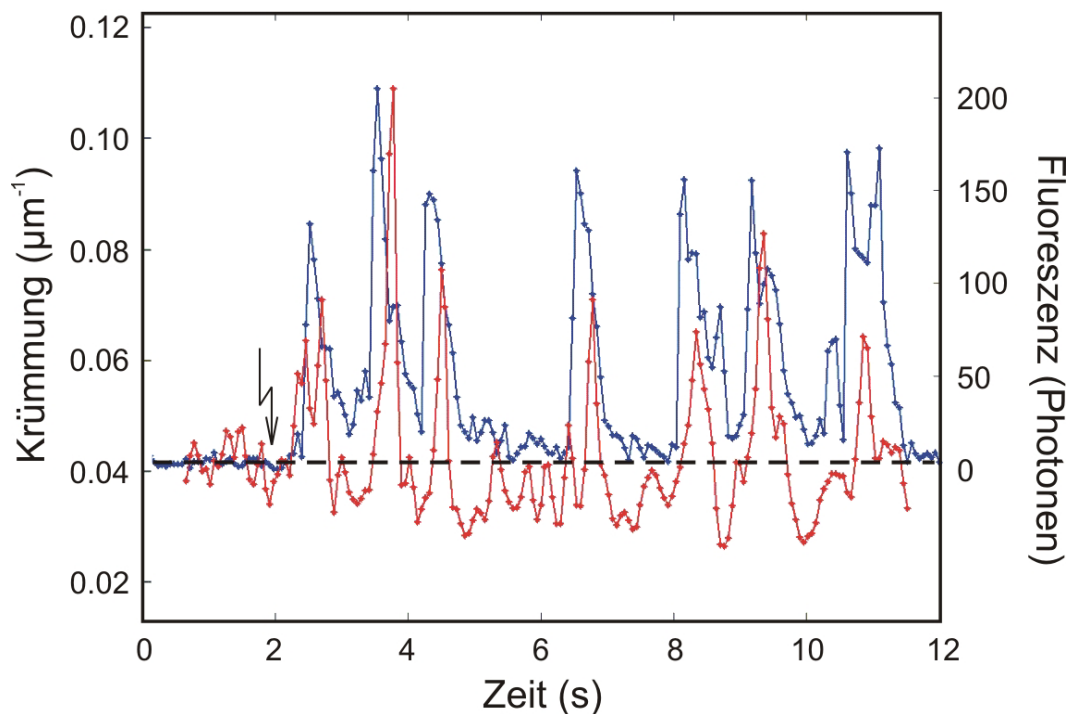


Abbildung 3.11: Ein Beispiel für ein komplexeres Muster von Ca^{2+} -Spikes im Flagellum nach Freisetzung von cGMP. Die Ca^{2+} -Änderungen sind in blau und der Verlauf der Krümmung ist in rot dargestellt. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt des UV-Blitzes.

3.2.2 Stimulus-Funktion und Ca^{2+} -Dynamik in schwimmenden *A. punctulata* Spermien in einem definierten Resact-Gradienten

Um die Ca^{2+} -Dynamik schwimmender Spermien in einem Lockstoff-Gradienten zu untersuchen, wurde mit Hilfe von *caged Resact* ein definierter Gradient im Gesichtsfeld des Mikroskops erzeugt und simultan das Schwimmverhalten und die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgezeichnet. Der Gradient wurde durch einen defokussierten UV-Blitz erzeugt. Die Lichtenergie des Blitzes war dadurch nicht homogen im Gesichtsfeld verteilt. Das Profil des Gradienten wurde aus der räumlichen Verteilung der Lichtenergie abgeleitet (Abb. 3.12; Material und Methoden 2.2.5). Nachdem der Gradient erzeugt worden war, bewegten sich die Spermien im Gradienten zu höheren Konzentrationen (Abb. 3.13). Das Muster der ausgelösten Ca^{2+} -Spikes im Gradienten war komplexer als nach der intrazellulären Freisetzung von cGMP (Abb. 3.14). Eine Reihe von größeren Ca^{2+} -Spikes war gefolgt von kleineren Spikes. Die Ca^{2+} -Spikes wurden kleiner je näher die Spermien dem Maximum des Gradienten kamen und der Gradient flacher wurde. Diese Anpassung ist vermutlich auf die anhaltende Stimulation der Spermien im Gradienten und auf einsetzende Adaptationprozesse zurückzuführen.

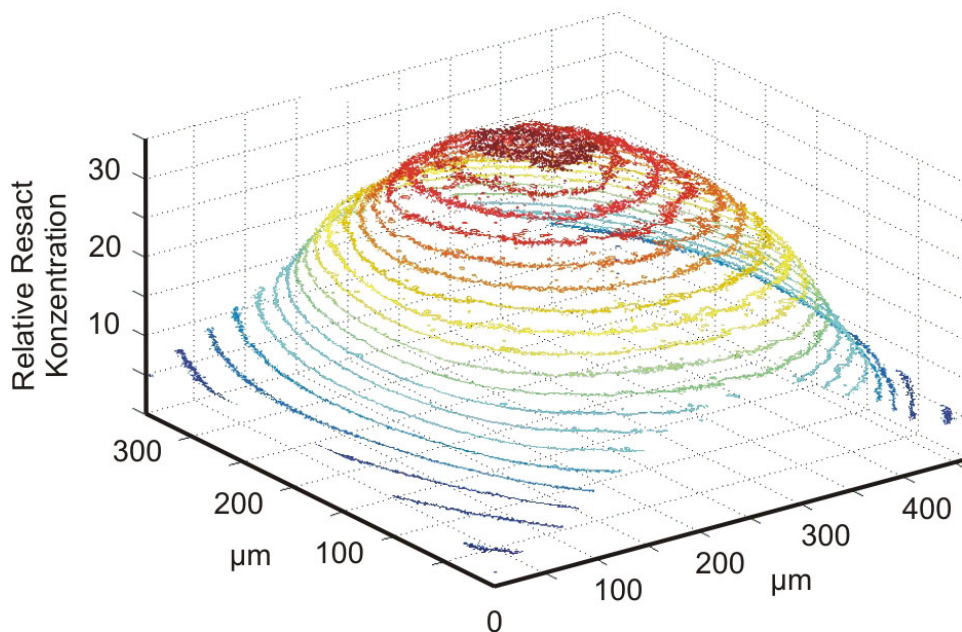


Abbildung 3.12: Konturlinien der Konzentrationen des Resact-Gradienten im Gesichtsfeld des Mikroskops erzeugt durch einen UV-Blitz. Angrenzende Linien repräsentieren eine Erhöhung um 2,5 Einheiten der relativen Resact-Konzentration.

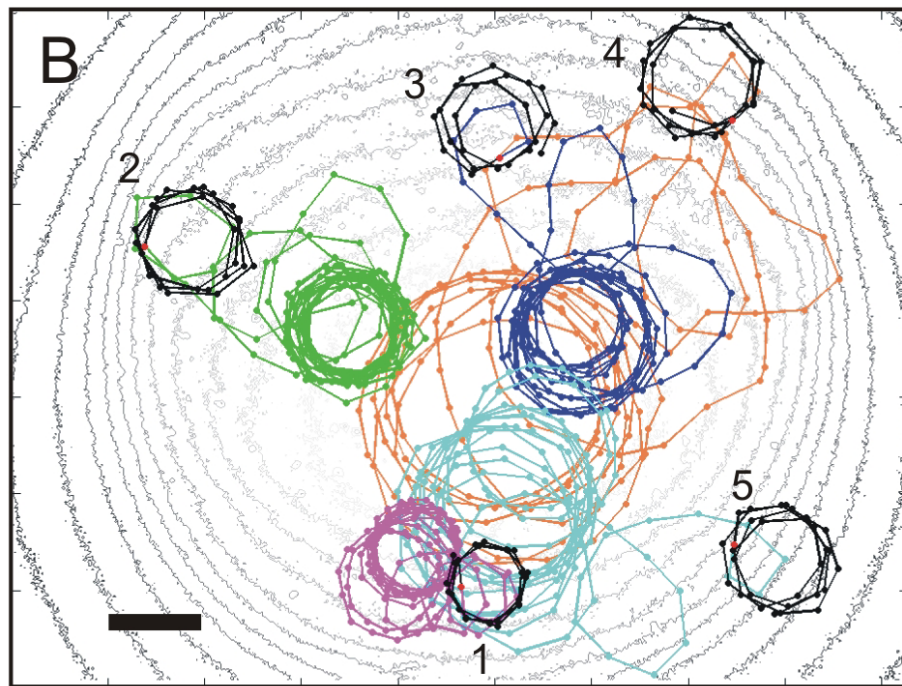


Abbildung 3.13: Schwimmtrajektorie von fünf Spermienzellen in einem Resact-Gradienten. Schwarze Linien kennzeichnen die Trajektorie vor und farbige Linien nach der Photolyse von caged Resact (150 nM). Die vorliegende Resact-Konzentration ist als topographische Karte des in Abb. 3.11 abgebildeten Gradienten dargestellt.

Kurz nach Beginn der Stimulation waren die Änderungen in der $[Ca^{2+}]_i$, unabhängig von ihrer Größe, eng mit den Änderungen der Krümmung korreliert (Abb. 3.14). In einer späteren Phase, wenn die Spermien langsam zum Normalverhalten zurückkehrten und wieder in Kreisen schwammen, hatten die ausgelösten Ca^{2+} -Spikes eine kleinere Amplitude. Die Änderungen in der Krümmung waren dementsprechend kleiner und kaum von dem „Rauschen“ zu unterscheiden. Dieses Verhalten ist besonders deutlich in den Spermienzellen Nr. 4 und Nr. 5 (Abb. 3.14) zu erkennen. Die minimalen Änderungen in der Krümmung spiegeln wahrscheinlich kleinste Korrekturen im Durchmesser und in der Position der geschwommenen Kreise wider. Offensichtlich adaptieren sowohl die Folge der Ca^{2+} -Spikes als auch die Verhaltensantwort auf die anhaltende Stimulation durch den Lockstoff. Solche adaptiven Mechanismen könnten auch erklären, warum in einigen Spermien ein Ca^{2+} -Spike ausgelöst wird, ohne eine Änderung in der Krümmung hervorzurufen und umgekehrt. Vermutlich muss ein bestimmter Ca^{2+} -Schwellenwert erreicht werden, um einen „turn“ im Schwimmverhalten auszulösen. Dieser Ca^{2+} -Schwellenwert scheint variabel zu sein.

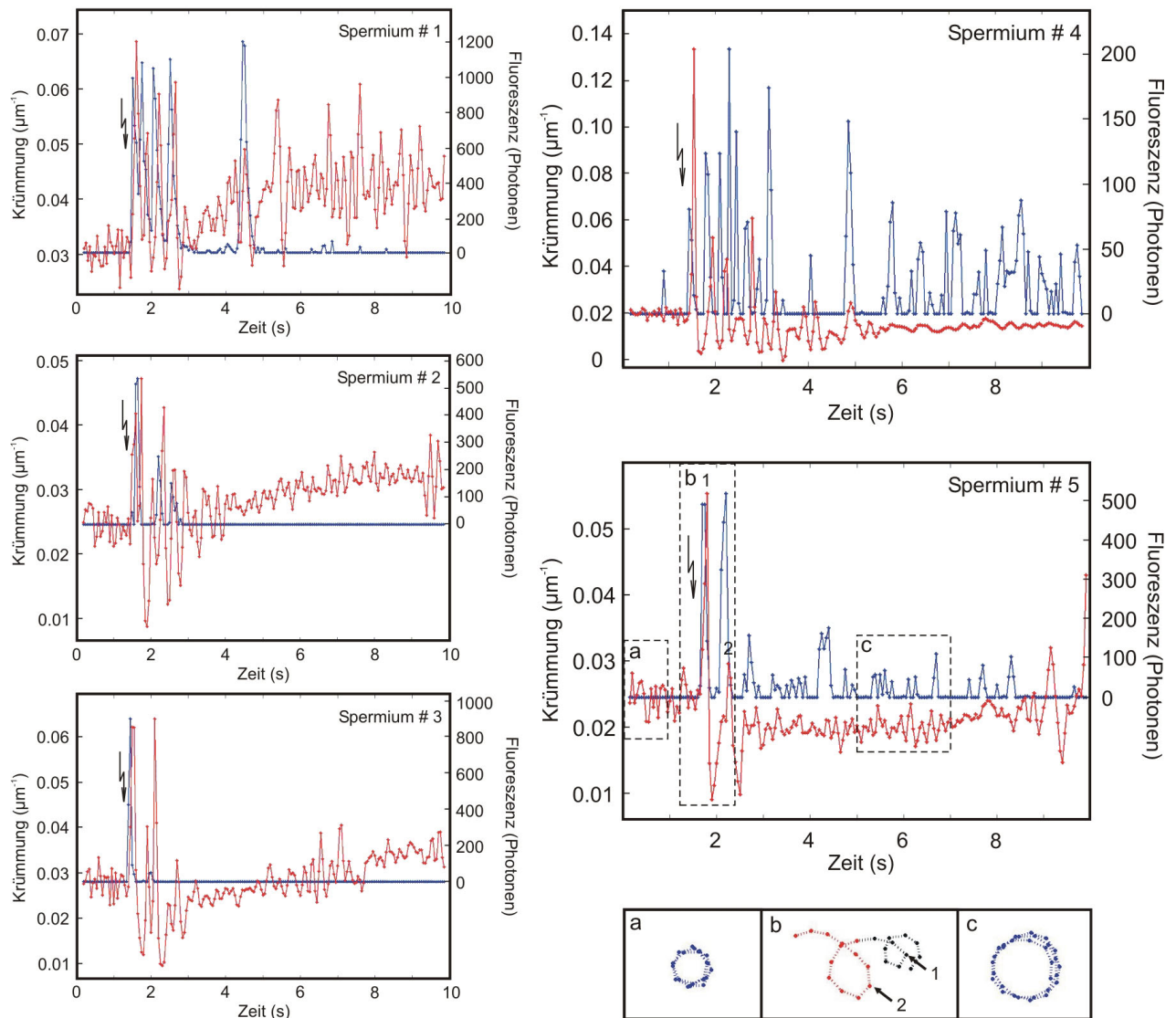


Abbildung 3.14: Änderung in der $[Ca^{2+}]_i$ und der Krümmung der fünf *A. punctulata* Spermien entlang der Trajektorie im Gradienten aus Abb. 3.13. Die Änderung in der $[Ca^{2+}]_i$ ist in blau und die Änderung der Krümmung ist in rot dargestellt. In den Kästen a-c ist die segmentierte Trajektorie von Spermium Nr.5 in dem gekennzeichneten Zeitbereich der Krümmung abgebildet. Die Zahlen an der Trajektorie im Kasten b beziehen sich auf die entsprechend nummerierten Peaks im Verlauf der Krümmung. Die Schwarzen Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt des UV-Blitzes.

Die Frage stellt sich, wann ein Ca^{2+} -Spike ausgelöst wird, der zu einer Verhaltensänderung führt, da Spermien in einem Gradienten einer anhaltenden Stimulation mit dem Lockstoff ausgesetzt sind. Diese Stimulation ist aber nicht gleichbleibend. Wenn *A. punctulata* Spermien sich in einem Resact-Gradienten bewegen, durchschwimmen sie aufgrund der spiralartigen oder epizykloiden Schwimmtrajektorie, abwechselnd Bereiche mit höherer und niedrigerer Resact-Konzentrationen. Diese periodisch-zunehmende Änderung der Resact-Konzentration im Gradienten spiegelt sich in der Stimulus-Funktion wider (siehe Material

und Methoden 2.2.7). Um zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen der Stimulus-Funktion, d.h. der periodisch-zunehmenden Resact-Konzentration und den ausgelösten Ca^{2+} -Spikes, besteht, wurde eine Kreuzkorrelations-Analyse durchgeführt. Durch diese Analyse kann herausgefunden werden, ob eine Beziehung zwischen zwei Zeitreihen (hier: die Stimulus-Funktion und die Ca^{2+} -Spikes) besteht, d.h. ob sie zeitlich korreliert sind. In Abb. 3.15 A sind die Stimulus-Funktion und die Ca^{2+} -Spikes entlang einer Trajektorie einer Spermienzelle im Gradienten dargestellt. Um einen Gradienten im gesamten Bildfeld zu erzeugen, wurde Resact aus *caged* Resact durch einen defokussierten UV-Blitz freigesetzt. Der UV-Blitz erzeugte zwei Effekte im Bildfeld: zum einen entstand im gesamten Bildfeld eine Erhöhung in der Resact-Konzentration und zum anderen wurde auf dieser Erhöhung ein Gradient erzeugt. Das bedeutet, dass Spermien, die sich im Bildfeld befanden, gleichzeitig durch eine Erhöhung der Resact-Konzentration und durch einen Gradienten stimuliert wurden. Die Zunahme der Konzentration zeigte sich in der Stimulus-Funktion in Form einer Stufenerhöhung. Danach nahm die Stimulus-Funktion aufgrund der epizykloiden Bewegungen der Spermien zu höheren Konzentrationen periodisch zu (Abb. 3.15 A). Es ist denkbar, dass dieses experimentelle Beispiel den Bedingungen der Spermien im Meer gleicht. Da Seeigel Spermien und Eizellen ins Meerwasser entlassen, ist es möglich, dass die Spermien durch Konvektion und Strömungen einer Kombination aus einer plötzlichen Erhöhung der Lockstoff-Konzentration und einem Gradienten ausgesetzt sind. Die Stimulation mit Resact in Form einer Stufenerhöhung (homogene UV-Belichtung, kein Gradient) löst eine ähnliche Folge von Ca^{2+} -Spikes aus wie die Stimulation mit cGMP (Vergleich Tab. 3.1 und 3.3). Das könnte bedeuten, dass die ersten Ca^{2+} -Spikes durch die Stufenerhöhung in der Stimulus-Funktion die Korrelations-Analyse beeinflussen könnten. Um dies zu überprüfen, wurde die Analyse einmal mit Hinzunahme der ersten Ca^{2+} -Spikes und einmal ohne die ersten Spikes durchgeführt. Die beiden Analysen zeigten weitgehend übereinstimmende Ergebnisse. In Abbildung 3.14 B ist die Autokorrelation der Ca^{2+} -Spikes und die Kreuzkorrelation der Stimulus-Funktion mit den Ca^{2+} -Spikes abgebildet. Die Korrelations-Analyse zeigt, dass die Stimulus-Funktion und die Ca^{2+} -Spikes synchronisiert sind. Die Phasenverschiebung zwischen der Kreuz- und Autokorrelation der Stimulus-Funktion betrug 280 ± 92 ms ($n = 19$) oder $156^\circ \pm 43^\circ$ (Abb. 3.14 C). Die Verzögerungszeit der Ca^{2+} -Erhöhung und folglich der Verhaltensantwort scheint eine konstante Größe und ein bedeutender Faktor für das chemotaktische Schwimmverhalten zu sein.

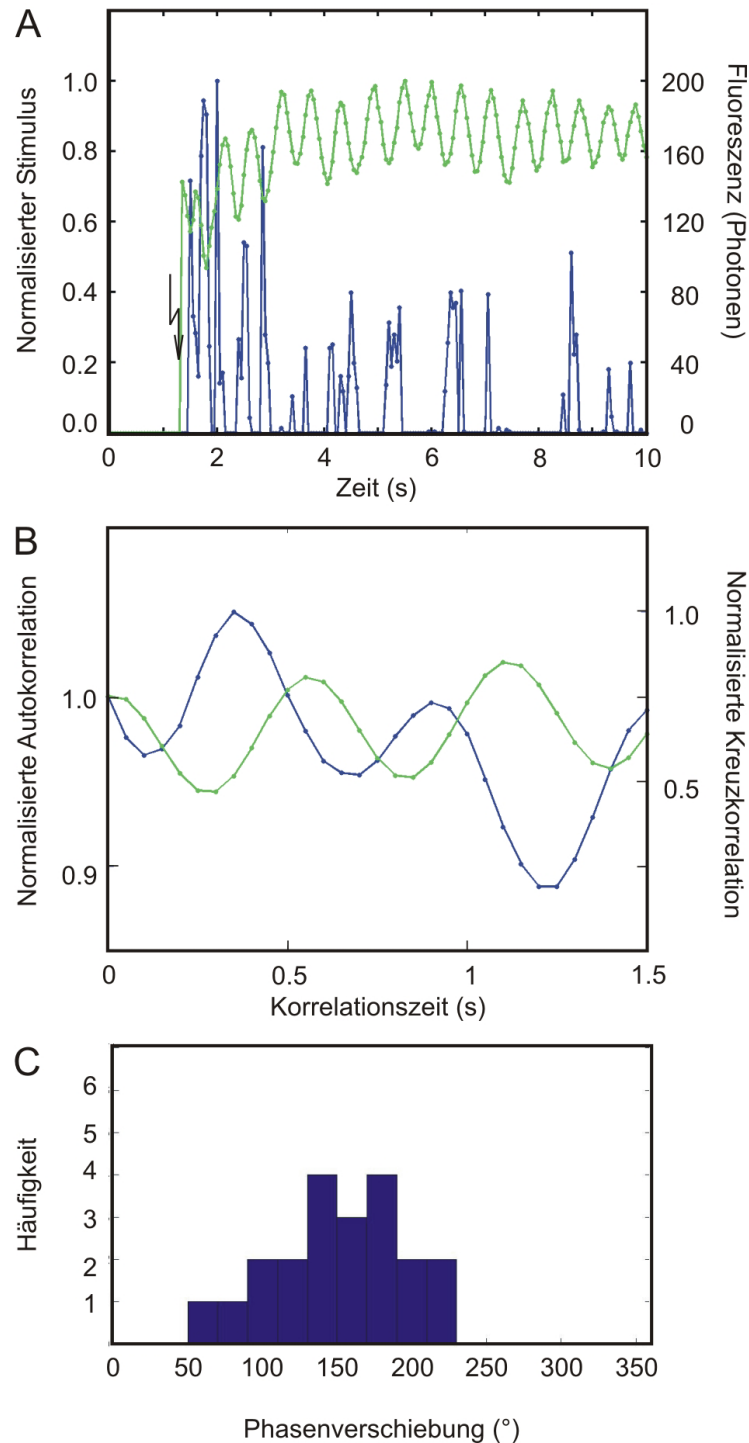


Abbildung 3.15: Stimulus-Funktion und Ca²⁺-Spikes von einer schwimmenden *A. punctulata* Spermienzelle in einem Resact-Gradienten. (A) Zeitverlauf der Stimulus-Funktion (grün) und Ca²⁺-Spikes im Flagellum (blau) einer Spermienzelle. Die Stufenerhöhung in der Stimulus-Funktion resultierte aus der Erzeugung des Gradienten (siehe Abb. 3.11) durch einen UV-Blitz (schwarzer Pfeil). Aufgrund der epizykloiden Bewegung der Spermienzelle zum Zentrum des Gradienten ist die Spermienzelle wiederholt einer zunehmenden und abnehmenden Resact-Konzentration ausgesetzt. Dies zeigte sich in einer periodisch-zunehmenden Stimulus-Funktion. Die Ca²⁺-Spikes folgten der Stimulus-Funktion mit einer kurzen Verzögerungszeit. **(B)** Autokorrelation der Stimulus-Funktion (grün) und Kreuzkorrelation zwischen der Stimulus-Funktion und der Ca²⁺-Spikes (blau) der Spermienzelle aus (A). **(C)** Histogramm der Phasenverschiebung, n = 19.

Tabelle 3.3: Quantitative Eigenschaften der Ca^{2+} -Antwort im Flagellum von *A. punctulata* Spermien nach Stimulation mit Resact¹.

Spermium- Nummer	Anzahl der Peaks in der Krümmung	Anzahl der Ca^{2+} - Spikes	Frequenz der Ca^{2+} - Spikes (Hz)	Verzögerungszeit des ersten Ca^{2+} - Spikes (s)	Amplitude der Ca^{2+} -Spikes (Photonen)	Halbwerts-Breite der Ca^{2+} -Spikes (s)
1	5	5	2.6	0.72	99 ± 46	0.22 ± 0.05
2	8	8	2.3	0.95	382 ± 90	0.21 ± 0.05
3	5	5	1.4	0.91	117 ± 60	0.18 ± 0.02
4	7	7	1.9	1.50	140 ± 73	0.19 ± 0.05
5	3	3	1.9	1.02	244 ± 48	0.20 ± 0.04
6	9	9	1.5	0.48	33 ± 11	0.16 ± 0.04
7	8	8	1.2	0.30	53 ± 24	0.22 ± 0.06
8	7	6	1.75	1.80	70 ± 34	0.19 ± 0.04
Mittelwert	6.5 ± 2.0	6.4 ± 2.0	1.8 ± 0.5	0.96 ± 0.50	142 ± 117	0.19 ± 0.02

¹Mittelwert ± Standardabweichung

3.2.2 Ca^{2+} -Dynamik in schwimmenden *A. amurensis* Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP

Astrosap und der Botenstoff cGMP lösen eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus (Matsumoto et al., 2003). Um zu überprüfen, ob die Abfolge von Biegungen und geradlinigen Bereichen in der Schwimmtrajektorie, wie in *A. punctulata* Spermien, durch cGMP-induzierte Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verursacht werden, wurden die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Experimente mit *A. amurensis* Spermien wiederholt. Die Ergebnisse der Experimente waren qualitativ ähnlich (Abb.3.16). Die Freisetzung von cGMP löste eine Folge von Ca^{2+} -Spikes im Flagellum aus. Bei der zeitlichen Überlagerung zeigte sich, dass ein Ca^{2+} -Spike einem Maximum in der Krümmung und somit einer Biegung im Schwimmen des Spermiums voraus geht.

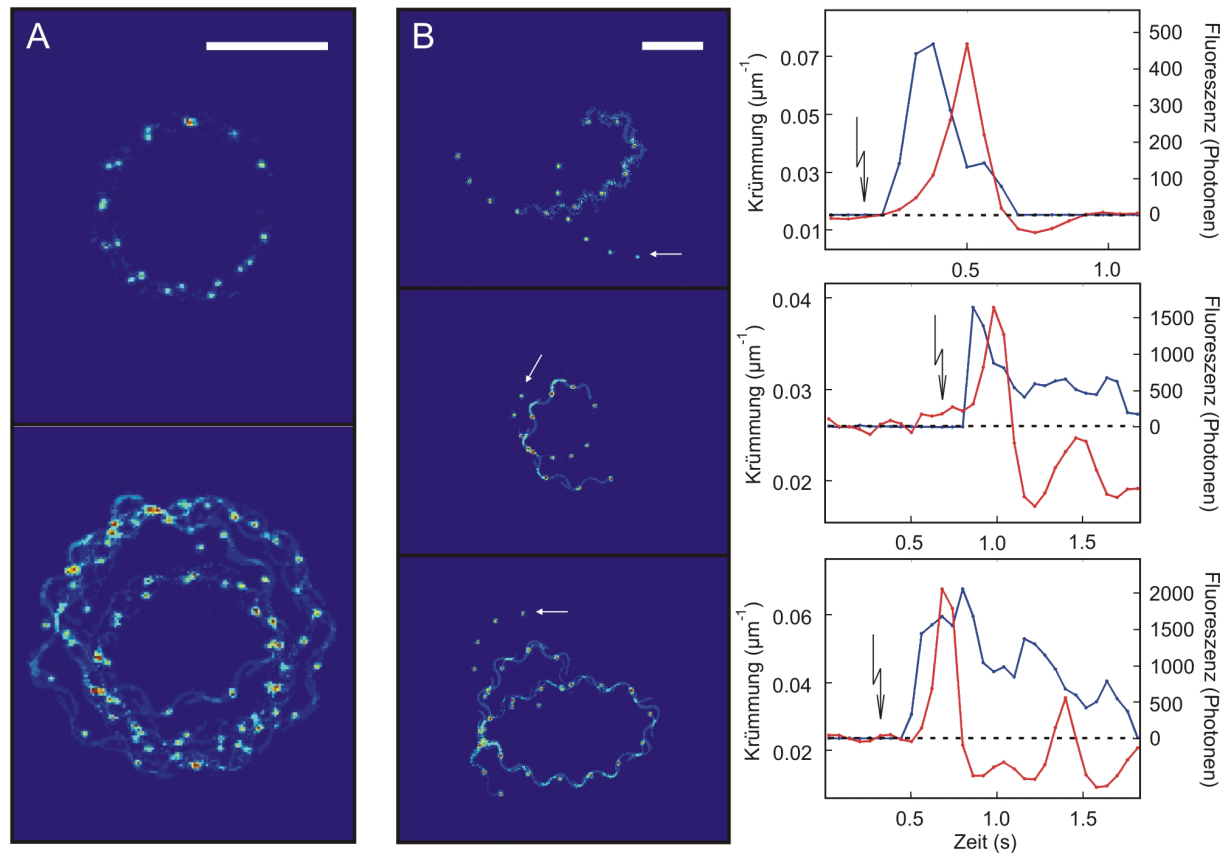


Abbildung 3.16: Ca^{2+} -Dynamik in schwimmenden *A. amurensis* Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. (A) Ca^{2+} -Fluoreszenz Signale einer Spermienzelle entlang der Schwimmtrajektorie vor (oben) und nach der Stimulation mit cGMP (unten). Die Hintergrundfarbe kennzeichnet eine lineare Skala der Fluoreszenz-Intensität; dunkelblau: null Photonen/Pixel; rot: 2000 Photonen/Pixel. (B) Rechts: Ca^{2+} -Fluoreszenz Signale von drei verschiedenen Spermienzellen entlang der ersten Biegung in der Trajektorie. Links: Entsprechende Änderungen der Fluoreszenz (blau) und der Krümmung (rot) vor, während und nach der Biegung. Die Trajektorie im untersten Kasten zeigt zwei Biegungen. Zu beachten ist die unterschiedliche Größenskalierung der Ordinaten. Das Intervall zwischen jedem Datenpunkt beträgt 60 ms. Die Balken entsprechen 50 μm . Die gestrichelte Linie kennzeichnet den pre-stimulus Wert der Krümmung. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt des UV-Blitzes.

Die Muster der Ca^{2+} -Spikes in *A. amurensis* Spermien nach der Freisetzung von cGMP waren teilweise sehr unterschiedlich. Drei Beispiele sind in Abb. 3.17 abgebildet. Die meisten Spermien reagierten mit einer Folge von abgesetzten Ca^{2+} -Spikes. Manchmal überlappten einige Ca^{2+} -Spikes (Abb. 3.17 Spermium Nr. 1 und Nr.3). Die Verzögerungszeit bis zum ersten Ca^{2+} -Spike im Flagellum war $0,17 \pm 0,04$ s ($n = 14$) (Tab.3.4) und die Zeit bis zum Erreichen des Maximums des ersten Ca^{2+} -Spikes war $0,2 \pm 0,1$ s (Tab. 3.4). Die Folge der Ca^{2+} -Spikes stoppte entweder abrupt (Abb. 3.17 Spermium Nr. 2) oder die Ca^{2+} -Spikes wurden graduell kleiner (Abb.3.17 Spermium Nr.3). Die Dauer der Ca^{2+} -Antwort im Flagellum betrug $2,7 \pm 1,3$ s (Tab. 3.4). In den meisten Spermienzellen waren die Ca^{2+} -Spikes

im Flagellum begleitet von einem Ca^{2+} -Einstrom im Kopf (Abb. 3.17). Einige Spermien zeigten nur eine geringe oder keine erkennbare Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Kopf. Die relativen Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Flagellum waren, wie in *A. punctulata* Spermien, deutlich größer als die Änderungen im Kopf.

Tabelle 3.4: Quantitative Eigenschaften der Verhaltensantwort und der Ca^{2+} -Dynamik in *A. amrunesis* Spermien nach Stimulation mit cGMP¹.

Spermium Nummer	Anzahl der Ca^{2+} -Spikes	Anzahl der Peaks in der Krümmung	Dauer der Folge der Ca^{2+} -Spikes (s)	Verzögerungszeit des ersten Ca^{2+} -Spikes (s)	Zeit zum Erreichen des Maximum des ersten Ca^{2+} -Spikes (s)
1	8	7	4.0	0.12	0.06
2	5	5	2.3	0.18	0.12
3	8	9	2.7	0.12	0.36
4	3	3	0.9	0.24	0.30
5	10	9	2.6	0.18	0.06
6	4	10	1.4	0.18	0.30
7	6	8	3.0	0.18	0.24
8	12	12	3.4	0.12	0.36
9	6	6	3.5	0.18	0.30
10	5	5	1.7	0.12	0.18
11	7	8	0.5	0.18	0.12
12	8	9	3.0	0.18	0.18
13	7	9	4.3	0.18	0.18
14	10	12	4.6	0.24	0.12
Mittelwert	7.1 ± 2.5	8.0 ± 2.6	2.7 ± 1.3	0.17 ± 0.04	0.21 ± 0.10

¹Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

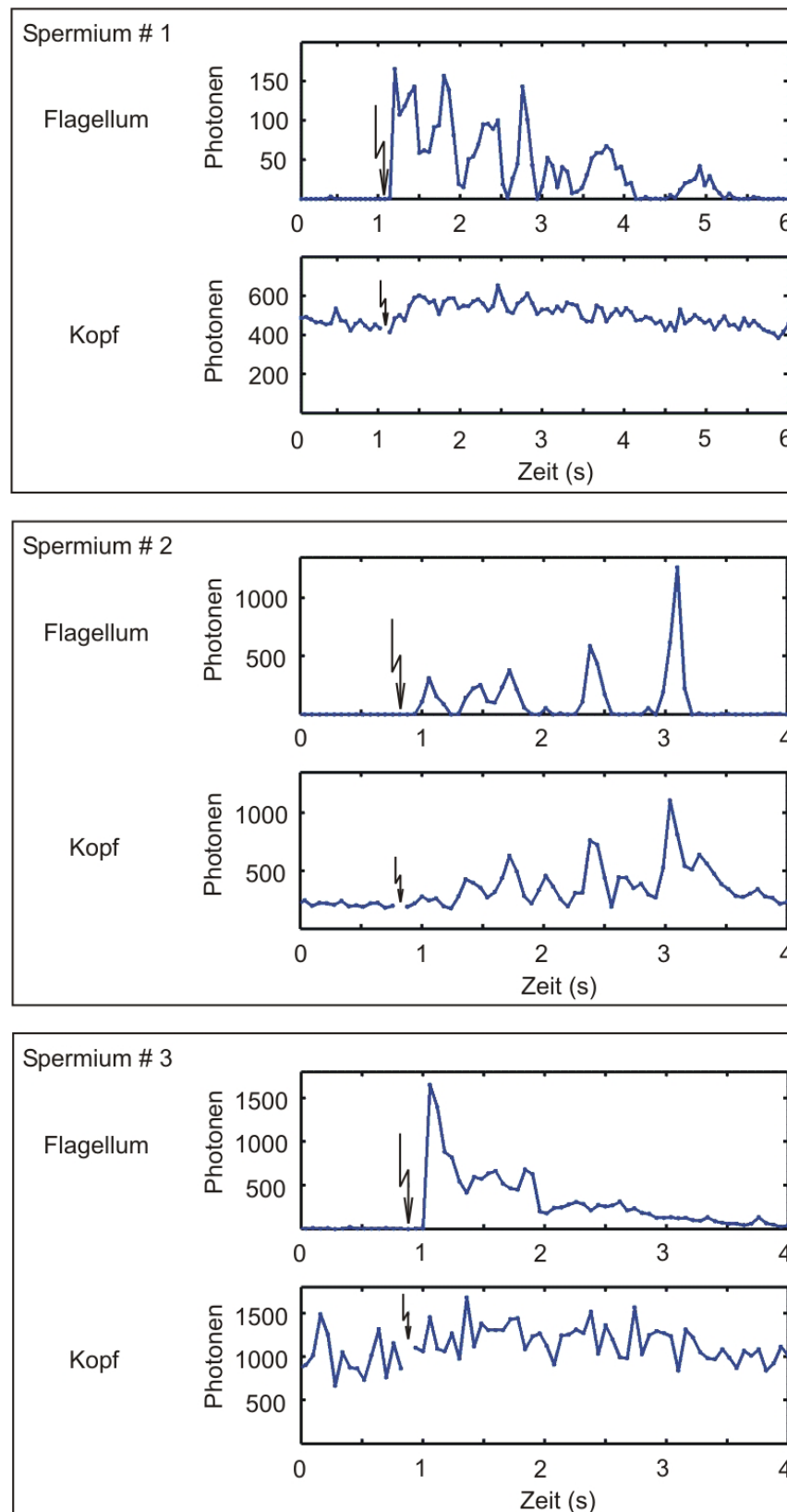


Abbildung 3.17: Ca^{2+} -Antworten im Flagellum und Kopf von drei verschiedenen *A. amurensis* Spermienzellen nach Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. Die Anzahl der Photonen wurde pro Flagellum bzw. Kopf bestimmt. Die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt des UV-Blitzes. Zum Zeitpunkt des Blitzes war eine Messung der Fluoreszenz nicht möglich.

Um zu überprüfen, ob die Änderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ das Schwimmverhalten beeinflussen, wurde die zeitliche Abfolge der Ca^{2+} -Spikes mit der zeitlichen Änderung in der Krümmung der Trajektorie verglichen. In vierzehn Experimenten, mit einer Ausnahme, ging die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ einer Zunahme der Krümmung voraus (Abb. 3.18). Gelegentlich änderte sich die Krümmung ohne einen entsprechenden Ca^{2+} -Spike. Die deutliche Übereinstimmung der Ca^{2+} -Spikes mit der Änderung in der Krümmung zeigte sich im Vergleich der mittleren Anzahl der Ca^{2+} -Spikes mit den Peaks in der Krümmung. Die Anzahl an Ca^{2+} -Spikes war $7,1 \pm 2,5$ und stimmt gut mit der Anzahl der diskreten Peaks in der Krümmung von $8,0 \pm 2,6$ überein. Wenn die $[Ca^{2+}]_i$ noch deutlich über der Ca^{2+} -Ruhekonzentration war, nahm die Krümmung bereits Werte an, die unter den pre-stimulus Werten lagen, d.h. die Trajektorie wurde geradliniger (Abb. 3.18). Auch hier wird, wie bereits bei den Seeigel-Spermien, angenommen, dass eine cGMP-induzierte Verhaltensantwort aus zwei unterschiedlichen Prozessen besteht: Eine Biegung gefolgt von geradem Schwimmen („turn and run“).

Ebenso wie in *A. punctulata* Spermien führte die Freisetzung von cGMP zu einer Zunahme der Schwimmgeschwindigkeit (Abb. 3.19). Nach dem UV-Blitz erreichte die Geschwindigkeit innerhalb 1 s ihr Maximum. Danach sank die Geschwindigkeit langsam wieder auf pre-Stimulus-Werte zurück. Die mittlere Geschwindigkeit vor der Stimulation betrug $334 \pm 86 \mu m^{-1}$ ($n = 14$) und $446 \pm 88 \mu m^{-1}$ nach der Stimulation (durchschnittliche relative Erhöhung 1,34; Irrtums-Wahrscheinlichkeit $P < 0,001$).

Die Ergebnisse der Experimente mit *A. amurensis* Spermien gleichen den Ergebnissen der Experimente mit Seeigel-Spermien. Der Mechanismus zur Kontrolle des chemotaktischen Schwimmverhaltens ist demnach in beiden Spezies in allen untersuchten Aspekten vergleichbar.

Die Freisetzung von cAMP löste keine Ca^{2+} -Spikes in *A. amurensis* Spermien aus. Dieses Ergebnis stimmt mit kinetischen Untersuchungen an Spermiesuspensionen überein, in denen die cAMP-induzierten Ca^{2+} -Signale im Vergleich zu den cGMP-induzierten Ca^{2+} -Signalen zehn Mal kleiner waren (Matsumoto et al., 2003). Wahrscheinlich sind die cAMP-induzierten Änderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ in einzelnen Spermien nicht detektierbar und zu gering, um eine Verhaltensantwort auszulösen.

Da es kein caged-Derivat von Asterosap gibt, wurde versucht in „Kapillarexperimenten“ (siehe 3.1.4) die Ca^{2+} -Änderungen von Spermien im Gradienten zu beobachten. Anhand der Fluoreszenz in den Köpfen war zu erkennen, dass sich die Spermien in epizykloiden Bewegungen der Kapillaröffnung näherten. Die Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ im Flagellum waren

kaum detektierbar. Die Ca^{2+} -Dynamik im Flagellum von *A. amurensis* Spermien in einem Asterosap-Gradienten konnte daher nicht analysiert werden.

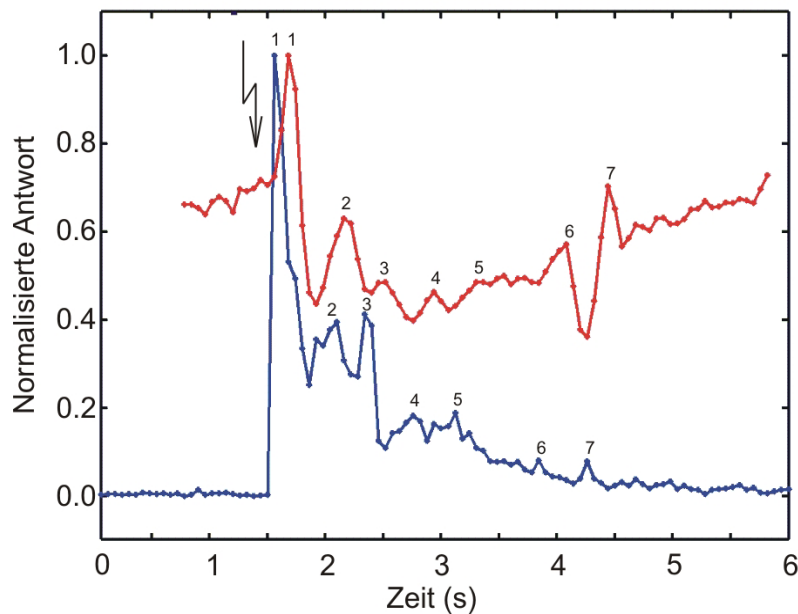


Abbildung 3.18: Krümmung und Ca^{2+} -Dynamik im Flagellum entlang der Schwimmtrajektorie einer *A. amurensis* Spermienzelle nach Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. Der Verlauf der Krümmung ist in rot und die Ca^{2+} -Spikes sind in blau dargestellt. Die Nummern kennzeichnen die Ca^{2+} -Spikes und die entsprechenden Peaks in der Krümmung. Ein Ca^{2+} -Spike geht einem Peak in der Krümmung voraus. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt des UV-Blitzes

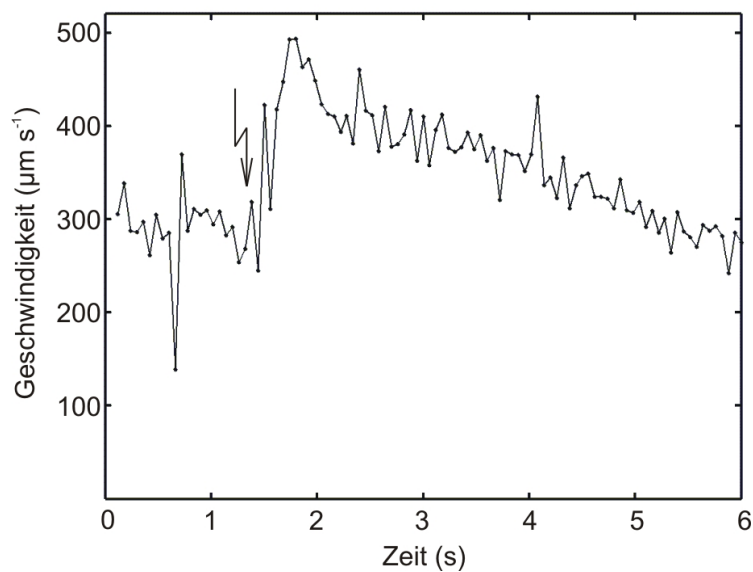


Abbildung 3.19: Verlauf der Geschwindigkeit einer *A. amurensis* Spermienzelle nach Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. Die Geschwindigkeit erreicht innerhalb 1 s nach dem UV-Blitz (schwarzer Pfeil) ihr Maximum und fällt danach graduell wieder zurück auf pre-stimulus Werte.

3.3 Molekularbiologische Untersuchungen zur Klonierung eines Gens, das für einen zyklisch-nukleotid gesteuerten Ionkanal (CNG-Kanal) kodiert

Das Kanalprotein, das für den cGMP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Vermutlich handelt es sich um einen zyklisch-Nukleotid gesteuerten Ionenkanal. Ein solcher CNG-Kanal, der K^{+} -selektiv wäre, könnte - nach dem postuliertem Modell - auch für eine Hyperpolarisation der Zelle verantwortlich sein. Ein CNG-Kanal ist in Seeigeln bisher nicht identifiziert worden. Diese Kanäle gehören zu der Familie der nicht-selektiven Kationenkanäle, zu der auch die hyperpolarisations-aktivierten und zyklisch-Nukleotid gesteuerten Ionenkanäle (HCN-Kanäle) gehören. Ein HCN-Kanal wurde bereits im Seeigel *S. purpuratus* identifiziert und charakterisiert (Gauss et al., 1998). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass HCN-Kanäle auch einen Ca^{2+} -Strom leiten (Yu et al., 2004; Zhong et al., 2004). Demnach könnte auch ein HCN-Kanal für den Ca^{2+} -Einstrom in den Spermien verantwortlich sein. In dieser Arbeit wurde vorrangig versucht einen CNG-Kanal zu identifizieren.

3.3.1 Amplifikation von cDNA Fragmenten mit der Polymerase-Kettenreaktion

In einer Traces-Datenbank des Genom-Projekts für den Seeigel *S. purpuratus* wurde von Dr. W. Bönigk ein Klon, der eine hohe Homologie zu CNG-Kanälen aufweist (siehe Anhang 7.1), aus verschiedenen Sequenzen zusammengestellt. Anhand dieser Sequenz wurden zwei Primer (siehe Anhang 7.1) synthetisiert, die den Bereich zwischen der Pore und dem Anfang der Bindestelle für zyklische Nukleotide flankieren. Der 5'-wärts gelegene Primer # 3845 fügt eine HindIII-Restriktionsschnittstelle (AAGCTT) und der 3'-wärts gelegene Primer # 3846 eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle (GAATTC) ein. Zur cDNA-Synthese wurde mRNA aus Hodengewebe von *S. purpuratus* isoliert und revers transkribiert. Mit den synthetisierten Primern wurde eine PCR auf der Hoden-cDNA durchgeführt. Es wurde ein PCR-Fragment von 494 Bp amplifiziert. Da mit den spezifischen Primer ein Fragment aus der Hoden-cDNA amplifiziert wurde, ist davon auszugehen, dass das vollständige Gen vorhanden ist. Die Enden des amplifizierten Fragmentes wurden mit HindIII und EcoRI verdaut. Anschließend wurde das Fragment gelelektrophoretisch gereinigt, in den entsprechend geschnittenen Plasmidvektor pBluescript SK⁻ ligiert und zur Kontrolle sequenziert.

3.3.2 Durchmustern und Isolierung von cDNA-Klonen aus einer *A. punctulata*-cDNA-Bibliothek

Eine OligodT-geprimte Hoden-cDNA Bibliothek aus *A. punctulata* wurde nach der cDNA eines CNG-Kanals durchmustert. Desweiteren wurde auch nach der cDNA des Orthologs eines HCN-Kanals (SpIH) aus *S. purpuratus* gesucht.

Um die cDNA-Bibliothek nach der vollständigen cDNA eines CNG-Kanals zu durchmustern, wurde das mit den Primern # 3845 und # 3846 amplifizierte PCR-Fragment (siehe 3.3.1) als Sonde (CNG-Sonde) eingesetzt. Bei der Suche nach der cDNA des Orthologs des SpIH-Kanals diente ein Fragment (726 Bp), das die Nukleinsäuresequenz des Bereichs zwischen S4 und der Bindestelle für zyklische Nukleotide enthielt (SpIH-Sonde). Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen Xho I und EcoRI aus dem Plasmid pc3SpIH, das das vollständige Gen des SpIH-Kanals enthält, herausgeschnitten.

Die Sonden-Fragmente wurden mit [α - 32 P]-dCTP radioaktiv markiert (2.3.13.1). Es wurden zwei Hoden-cDNA Bibliotheken (je ca. 1.000.000 Plaque-bildende-Einheiten) ausplattiert (2.3.12.3). Filterabzüge der Platten wurden unter niedriger Stringenz mit den Sonden hybridisiert.

Um zu überprüfen, ob die cDNA-Bibliothek genügend rekombinante cDNA-Fragmente enthielt wurde sie mit einer Kontroll-Sonde durchmustert. Als Kontroll-Sonde diente ein PCR-Fragment (403 Bp) das mit den Primern # 2786 und # 2787 aus *A. punctulata* Hoden-cDNA amplifiziert wurde. Die Sonde enthielt die Nukleinsäuresequenz eines Teils der Kinase-Homologie-Domäne der Guanylyl-Zyklase (GC). Dieses Fragment wurde bereits erfolgreich als Sonde eingesetzt, um die vollständige cDNA der GC zu klonieren (Van, 2002). Im Grobscreen mit der Kontroll-Sonde wurden 58 Hybridisierungs-Signale erhalten. Die hohe Anzahl von positiven Signalen bestätigt, dass die cDNA-Bibliothek genügend rekombinante cDNA-Fragmente enthält. Es wurde darauf verzichtet, die Phagen den Plaqueregionen zuzuordnen und in einem Feinscreen zu vereinzeln.

Im Grobscreen mit der CNG-Sonde wurden 34 Hybridisierungs-Signale erhalten und den Plaqueregionen zugeordnet. Im Feinscreen wurden keine Hybridisierungs-Signale erhalten. Um zu überprüfen, ob die CNG-Sonde homologe Sequenzbereiche markiert, diente eine *Southern Blot* Analyse (Abb. 3.20) als Hybridisierungskontrolle. Hierzu wurden die Plasmide pcA-rCNC α 2b und pcA-ROCNC1 β Cam-3, die die vollständige Sequenz der A3-Untereinheit bzw. eine modifizierte A2-Untereinheit der CNG-Kanäle aus der Ratte enthalten, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Unterschiedliche Verdünnungen der

Restriktionsansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ein Filterabzug des Gels wurde zusammen mit den Filterabzügen der Platten der cDNA-Bibliothek unter niedriger Stringenz mit der CNG-Sonde hybridisiert. In allen Spuren des *Southern Blots* waren Hybridisierungssignale unterschiedlicher Stärken entsprechend der jeweiligen Verdünnung zu erkennen (Abb. 3.20). Das Ergebnis zeigt, dass die eingesetzte CNG-Sonde homologe Sequenzbereiche markiert.

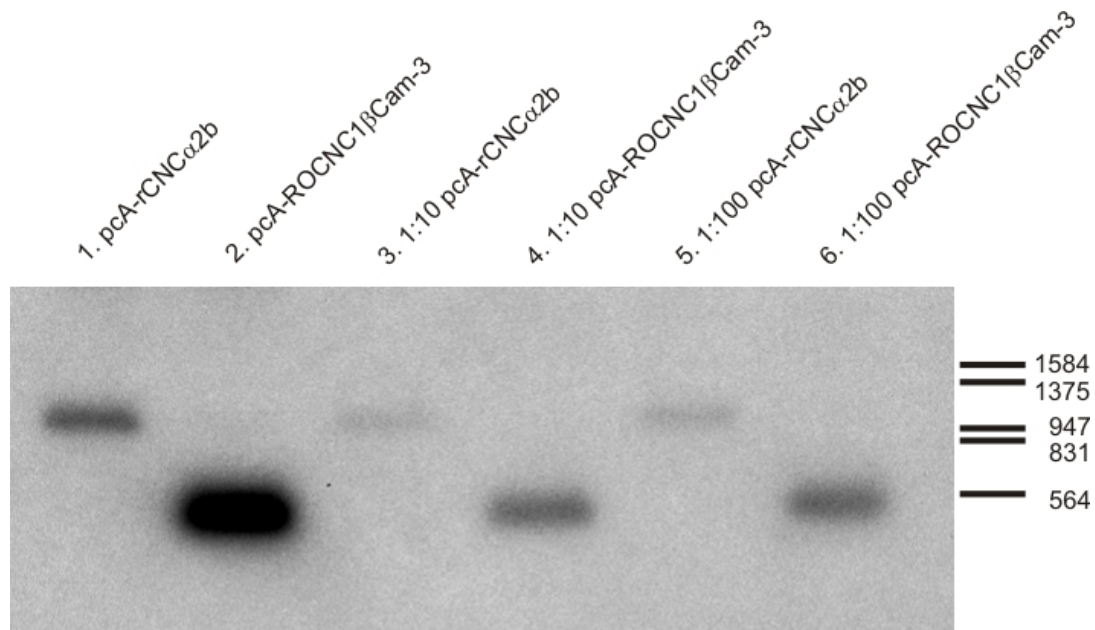


Abbildung 3.20: Southern Blot Analyse als Hybridisierungskontrolle. Aufgetragen wurden unterschiedliche Mengen geschnittener Plasmide. Das Plasmid pcA-rCNCα2b (Spur 1 und in den angegebenen Verdünnungen in den Spuren 3 und 5) enthält die vollständige Sequenz der A3-Kanaluntereinheit aus der Ratte und wurde mit HindIII und BamHI geschnitten. In Spur 1 wurden ca. 53 ng DNA aufgetragen. Die Bande in Spur 1 (Größe: 1021 Bp) entspricht ca. 7,4 ng DNA. Das Plasmid pcA-ROCNC1βCam-3 (Spur 2 und in den angegebenen Verdünnungen in den Spuren 4 und 6) enthält die vollständige Sequenz einer modifizierten A2-Kanaluntereinheit aus der Ratte und wurde mit HindIII und XhoI geschnitten. In Spur 2 wurden ca. 45 ng DNA aufgetragen. Die Bande in Spur 2 (Größe: 443 Bp) entspricht ca. 3 ng DNA. Die Fragmentgrößen EcoRI/HindIII geschnittener Lambda-DNA sind rechts neben dem Autoradiogramm angegeben.

Im Grobscreen mit der HCN-Sonde wurden 13 Hybridisierungssignale erhalten und den Plaqueregionen zugeordnet. Die Plaqueregionen wurden ausgestochen und die Phagen vereinzelt (2.3.12.4). Im Feinscreen wurden 14 vereinzelte, unabhängige Phagen ausgestochen und durch „in vivo excision“ in pTriplEx2-Derivate überführt. Die cDNA-Inserte der Klone wurden mit Sfi I herausgeschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Klone hatten Inserte von ca. 1500 Bp und ca. 2500 Bp. Die Inserte wurden in das Plasmid

pBluescriptSK⁺Extended ligiert und vom 5'-Ende ansequenziert. Diese Klone wurden als ApIH-Klone bezeichnet. Die Abbildung 3.21 zeigt einen Vergleich der Nukleotidsequenzen im 5'-Bereich zwischen den ApIH-Klonen und dem SpIH-Kanal. Den Klonen, die ein 1500 Bp-Insert trugen, fehlten am 5'-Ende 1223 Bp der SpIH-Sequenz. Die Klone, die das 2500 Bp-Insert trugen, waren am 5'-Ende um 716 Bp kürzer als die SpIH-Sequenz. Ihre Sequenz wich in den ersten 352 Nukleinsäure-Positionen (Nukleinsäure-Positionen 717 bis 1068 der SpIH-Sequenz) von der SpIH-Sequenz ab. Eine Homologie zeigte sich ab der Position 1069 der SpIH-Sequenz.

SpIH	CGGGAGAATAGTGCACCAAGGGATGCCCGTGAAATATTAATTAAACGTTTTTAAGAACAT	- 60
SpIH	CATCAAACCCGGGCCCCATCATGAAGGAATAACAAGGCCTTCGAAAAGTATGGGAAACTG	- 120
SpIH	GTCGGCAGGACATCAGCATTATTAATTCTAGGAAACTCATTATGGATAACAAGGAACTA	- 180
SpIH	ACGGAGAGCTAGAGCAGTCTGATGAGGCCGATCCGTCCGGTCAAAACCTTGATGATGGGG	- 240
SpIH	AAACCGATAGCAAAACAAGAAGAGAATCTCATCAACGTTAGCCCGCCAAAAACACCGCCAG	- 300
SpIH	GTCCTCCTCCTCCTCTAAAGAATGGAGGAAGGGTTCAGAAACCGCCCAAAATCCCAATAT	- 360
SpIH	GTCATCAAAATGGAAAGCTCCCCAAGGAAGTTGAATGGACAGAAGACAGAGGCGAAGACA	- 420
SpIH	GAAAGGATAGTCTCACTCTTCAATCAAAGCTAGATCACGGGGCATAACGGATGAGAAAC	- 480
SpIH	AGGATCTTCTAACATATCTTGACCGTCACGGCATCAACAGTCCAGTCAAGTAAACACCAG	- 540
SpIH	ATGAAACTGGAGGGAGCAGTGCTTTGGATATCTTGGGATTATTGAAGAGAGGGACACTG	- 600
SpIH	GTGCACTAGGCTCTGATCCCTCATCCACTATGCAGGCCATGGCTAAACCTGTAGGCTTTC	- 660
SpIH	TGCAGAGGCAGCTATGGACTGTCTCCACCTTCAGACAATAGACTCTCCATGAACTTT	- 720
ApIH (a)	GAGA	- 4
SpIH	TCGGAAGCAAGAAAGGGTTACAAAAGGAAAAATATCGGCTGAGGAAGCGGGGGTTCTTA	- 780
ApIH (a)	AGACCGCGGGAAAGCTGTGAGGGGCGGGAGATGTAGGAGCCAATTTTGCCCGTGATATAT	- 64
SpIH	TCATTCATCCATGTAGTCATTTCAGATTTTACTGGGATCTACTGATGCTGTGCTCTGATCA	- 840
ApIH (a)	TTGTAAACGACCCCTTTTATATCTGAATAAACGGACTGCACCGTCACCATGGAACGCTA	- 124
SpIH	TGGCAAACGTCATCCTCCTACCCGTCGTCATTACTTTCTTCCACAACAAGGACATAGTA	- 900
ApIH (a)	GGCATGACACGTAATGGATTATATTCACCGATCGGCTGAGCATTATTTTGTAAACG	- 184
SpIH	CGGGTTGGCTCATCTTTAATGTCTCTCAGATACCTTCTTCATTCTCGATCTCATCTGCA	- 960
ApIH (a)	GGACACTCATGATGGAACGGAAGGTGCCACCCCTAGCTGCAGGCGAGAGTAGCGATGACG	- 244
SpIH	ACTTTCGGACCGGCATCATGAATCCGAAGTCGGCCGAACAGGTGATCCTCAACCCCGTC	- 1020
ApIH (a)	CCGATCAATTTCTCTGAAGATTGGAAGACGCAAGTCAGCAACGATCAGAAACGCAAT	- 304
SpIH	AAATCGCCTATCATTATCTCCGTTTCATGGTTCATCATCGATCTCGTGTCTTCCATCCCCA	- 1080
ApIH (a)	CAGTGAACCTCATTAACGTAGTCTTGTAAGAACACCCCTAACCCACCTTCCATCCCCA	- 364
SpIH	TGGACTACATCTTCTCCTCGCTGGCGGCCAGAACCGTCACTTCTCGAGGTGTCCCGAG	- 1140
ApIH (a)	TGGACTACATCTTCTACTCGCCGGCGGCAGCAACCGCCGCTTCTACGAGGTGTGCGGG	- 424
SpIH	CCCTCAAGATACTGCGCTTTGCCAAGCTCCTCAGTCTTCTTCGACTCCTGCGTCTGTCCA	- 1200
ApIH (a)	CGCTCAAGATCCTGCGCTTCGCCAAACTGTGAGCCTGCTGCGCTGCTCCGTCTGTCTA	- 484
SpIH	GGCTCATGCGGTTTCGTCAGTCAATGGGAACAGGCTTCAACGTAGCCAATGCCGTATCC	- 1260
ApIH (a)	GGCTCATGCGCTTTCGTAGCCAATGGGAACAGGCTTTCACAGTGGCAACGCTGTCTATCC	- 544
ApIH (b)	TGGGAACAGGCTTTCACAGTGGCAACGCTGTCTATCC	- 37
SpIH	GGATCTGTAATCTAGTGTGTATGATGCTTCTGATTGGCCATTGGAATGGCTGCCTTCAAT	- 1320
ApIH (a)	GGATCTGCAACCTGTTTGTATGATGCTTCTGATTGGCCATTGGAACGGCTGCCTTCAAT	- 604
ApIH (b)	GGATCTGCAACCTGTTTGTATGATGCTTCTGATTGGCCATTGGAACGGCTGCCTTCAAT	- 97
SpIH	ATCTCGTGCCCATGTGTGCAAGAATACCCCGACCAATCATGGGTGCGCCATTAAATGGCCTTG	- 1380
ApIH (a)	ACCTCGTACCCATGTGTGCAAGAATACCCCGACCAATCATGGGTGCGCAATAAATGGCCTTG	- 664
ApIH (b)	ACCTCGTACCCATGTGTGCAAGAATACCCCGACCAATCATGGGTGCGCAATAAATGGCCTTG	- 157
SpIH	AGCACGCTCATTGGTGGGAGCAGTATACATGGGCACTCTTCAAAGCCCTTTTCGCACATGC	- 1440
ApIH (a)	AGAACGCGCATTGGTGGGAGCAGTACACATGGGCTTGTTCAGGCGCTGTGCGCATATGC	- 724
ApIH (b)	AGAACGCGCATTGGTGGGAGCAGTACACATGGGCTTGTTCAGGCGCTGTGCGCATATGC	- 217

Abbildung 3.21: Nukleinsäure-Sequenzvergleich zwischen der veröffentlichten SpIH-Sequenz und den isolierten ApIH-Klonen. Abgebildet ist das 5'-Ende der Sequenzen. Abweichende Nukleinsäuren sind in rot dargestellt. Die Klone, die ein ca. 2500 Bp-Insert trugen sind als ApIH (a) und die, die ein ca. 1500 Bp-Insert trugen sind als ApIH (b) bezeichnet. Der homologe Bereich ist durch fettgedruckte Buchstaben dargestellt.

3.3.3 Southern Blot Analyse genomischer *A. punctulata* DNA

Ein Ortholog des SpIH wurde in *A. punctulata* identifiziert (3.3.2). Daher ist es ebenso wahrscheinlich, dass ein Ortholog des CNG-Kanals in *A. punctulata* existiert. Das Durchmustern der Hoden-cDNA Bibliotheken mit einer CNG-Sonde war nicht erfolgreich. Um mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen, ob das Gen im Genom vorhanden ist, wurde eine *Southern Blot* Analyse mit gesamtgenomischer *A. punctulata* DNA durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA aus *dry sperm* präpariert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Filterabzug wurde mit unterschiedlichen radioaktiv-markierten Sonden hybridisiert (Abb. 3.22). Mit der CNG-Sonde wurde hybridisiert, um das Gen für dieses Protein nachzuweisen zu können (Abb. 3.22 A). Zur Kontrolle wurden die Filterabzüge mit der SpIH-Sonde (Abb. 3.22 B) und einer ApIH-Sonde (Abb. 3.22 C) hybridisiert. Die ApIH-Sonde ist ein EcoRI/HindIII geschnittenes 928 Bp großes Fragment eines isolierten ApIH-Klons. In allen Spuren des *Southern Blot* waren Hybridisierungssignale zu erkennen. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Gen, das für den putativen CNG-Kanal kodiert, im Genom des Seeigels *A. punctulata* existiert.

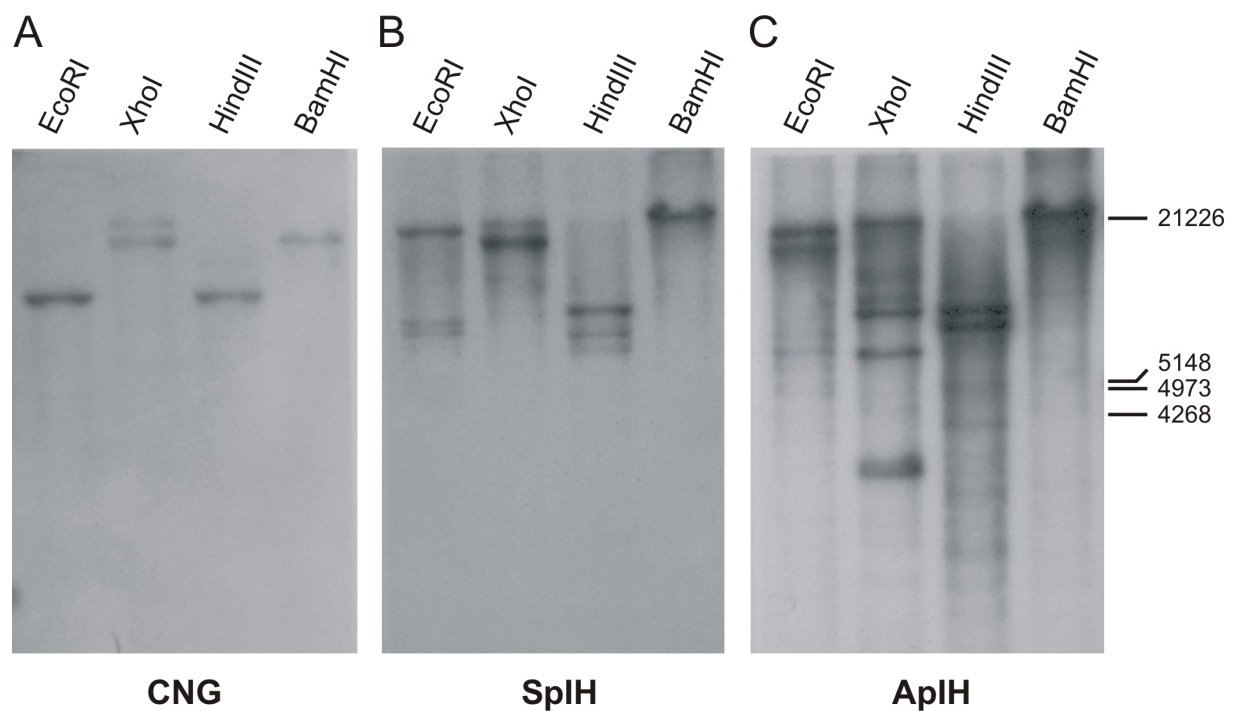


Abbildung 3.22: Southern Blot Analyse genomischer *A. punctulata* DNA. Aufgetragen wurde genomische *A. punctulata* DNA, die mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen (EcoRI, XhoI, HindIII, BamHI) verdaut worden war. In jeder Spur wurden ca. 300 ng DNA aufgetragen. Die Filterabzüge wurden mit der CNG-Sonde (A), der SpIH-Sonde (B) und mit der ApIH-Sonde (C) hybridisiert. Die Fragmentgrößen EcoRI/HindIII geschnittener Lambda-DNA sind rechts neben dem Autoradiogramm angegeben.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das chemotaktische Schwimmverhalten von Spermien des Seeigels *A. punctulata* und des Seesterns *A. amurensis* analysiert. Sowohl die intrazelluläre Freisetzung des Botenstoffs cGMP als auch die extrazelluläre Stimulation der Spermien in einem Lockstoff-Gradienten lösten eine Folge von Ca^{2+} -Spikes im Flagellum aus, die die Schwimmtrajektorie steuern. Es wurde gezeigt, dass eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einer Änderung im Schwimmverhalten vorausgeht. Ein Ca^{2+} -Spike löst eine kombinierte Verhaltensantwort aus („turn and run“). Eine Kreuzkorrelations-Analyse zeigt, dass die Ca^{2+} -Spikes im Flagellum mit der Stimulus-Funktion im Lockstoff-Gradienten synchronisiert sind. Ein CNG-Kanal, der für eine mögliche Hyperpolarisation oder für den Ca^{2+} -Einstrom in den Spermien verantwortlich sein könnte, konnte in molekularbiologischen Untersuchungen bisher nicht identifiziert werden.

4.1 Ca^{2+} -Spikes bestimmen das chemotaktische Schwimmverhalten von Spermien

In einem Modell, das das Schwimmverhalten von Spermien in einem Gradienten beschreibt, wird angenommen, dass Spermien geradeaus schwimmen, wenn sie sich den Gradienten „aufwärts“ bewegen und ihre Schwimmrichtung durch eine Biegung ändern, wenn sie in entgegengesetzte Richtung schwimmen (Cook et al., 1994). Das Modell setzt voraus, dass die Spermienzelle sowohl zunehmende als auch abnehmende Konzentrationen in einem Gradienten detektieren kann. Dieses Schwimmverhalten wurde folgendermaßen erklärt: wenn die Spermienzelle den Gradienten „aufwärts“ schwimmt, führt die Stimulation mit dem Lockstoff zu einer Hyperpolarisation und zu einer Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch einen spannungsabhängigen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Wenn die Spermienzelle den Gradienten „abwärts“ schwimmt, inaktiviert die Rezeptor-GC, die Zelle repolarisiert und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steigt wieder an. Dieses Modell basiert auf den Ergebnissen von Brokaw (1979), dass eine hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu einer erhöhten Asymmetrie des Flagellums und damit zu einer größeren Krümmung der Schwimmtrajektorie führt und eine niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu einer niedrigen Asymmetrie und damit zu einer geringeren Krümmung führt. Dieses Modell steht aber im Widerspruch zu kinetischen Untersuchungen, die zeigen, dass eine Stimulation mit dem Lockstoff oder cGMP zu einer schnellen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt – und nicht zu einer Abnahme (Kaupp et al., 2003; Matsumoto et al., 2003). Auch ist das chemotaktische Schwimmverhalten von

Spermien mariner Invertebraten komplexer als im Modell angenommen. Spermien schwimmen nicht geradlinig auf die Lockstoff-Quelle zu, sondern nähern sich durch epizykloid-artige Bewegungen. Das „Rätsel“, warum Spermien zunächst nicht reagieren, wenn sie in Richtung eines zunehmenden Gradienten schwimmen, obwohl der Lockstoff einen Ca^{2+} -Einstrom auslöst wird in dieser Arbeit aufgeklärt (Abb. 4.1). In einem Lockstoff-Gradienten detektiert eine Spermienzelle, die auf einer Kreisbahn schwimmt, für eine kurze Zeit eine erhöhte Lockstoff-Konzentration, solange sie den Gradienten „aufwärts“ schwimmt. In dieser Phase wird die Zelle mit Lockstoff stimuliert („Mess-Phase oder *Sampling*-Phase“). Nach einer Verzögerung von ca. 300 ms wird ein Ca^{2+} -Spike ausgelöst. Auf den Ca^{2+} -Spike reagiert die Zelle mit einem „turn and run“-Verhalten. Aufgrund der Verzögerungszeit des Ca^{2+} -Einstroms schwimmt die Spermienzelle zunächst noch etwa einen halben Kreis, der im Gradienten „abwärts“ gerichtet ist, bevor sie mit einem „turn“ reagiert. In anderen Worten, das geradlinige „aufwärtsgerichtete“ Schwimmen erfolgt nicht durch eine Lockstoff-induzierte Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sondern durch die Verzögerung der Verhaltensantwort. Eine Arbeit von Nishigaki et al. (2004) zeigte jedoch, dass es zu einer transienten Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ innerhalb der ersten 200 ms nach einer Stimulation mit Lockstoff bzw. cGMP kommt. Die Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist sehr gering und beträgt nur wenige Prozent des gemessenen Ca^{2+} -Fluoreszenzsignals ($\Delta F/F_0 < 2\%$). Eine transiente Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte in schnellen kinetischen Messungen mit Resact (Zeitauflösung von ca. 10 ms) nicht beobachtet werden (Kaupp et al., 2003). Selbst wenn die Beobachtung von Nishigaki et al. zutreffen sollte, hat diese transiente Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sicher keine physiologische Bedeutung für das Schwimmverhalten, da Spermien frühestens ca. 350 ms nach einer Stimulation mit einer Verhaltensänderung reagieren (Kaupp et al., 2003).

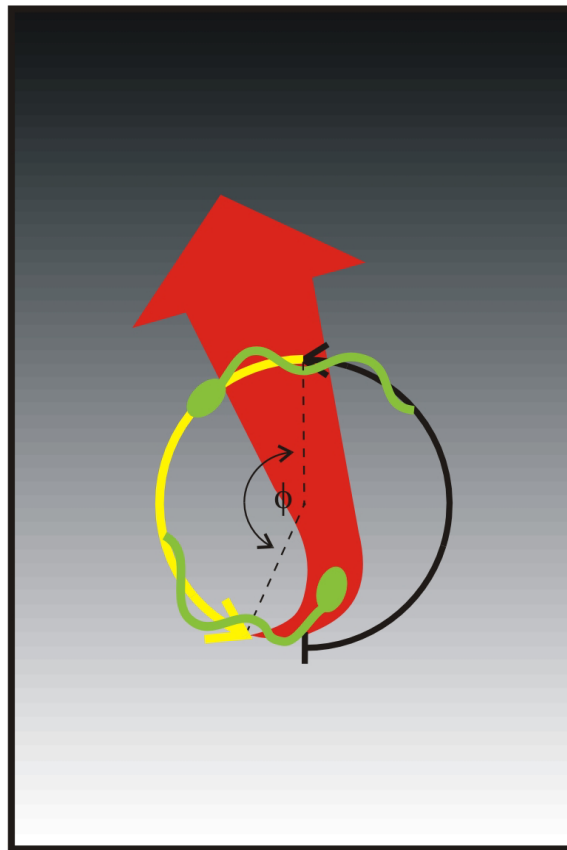


Abbildung 4.1: Modell des chemotaktischen Verhaltens von Spermien. In einem Lockstoff-Gradienten (Hintergrund; weiss: niedrige Konzentration, schwarz: hohe Konzentration) detektiert eine Spermienzelle (grün), die auf einer Kreisbahn schwimmt, eine erhöhte Konzentration des Lockstoffs, wenn sie den Gradienten „aufwärts“ schwimmt (*Sampling-Phase*; schwarze Linie). Während die Zelle den Gradienten „abwärts“ schwimmt (gelber Abschnitt des Kreises von ca. 160°, Verzögerungs-Winkel ϕ ; entsprechen ca. 300 ms) wird ein Ca^{2+} -Spike ausgelöst und die Zelle reagiert mit einer transienten Erhöhung der Krümmung der Trajektorie (rot). Danach fällt die Krümmung unter pre-stimulus Werte und die Zelle bewegt sich wieder in Richtung des „aufwärts“ gerichteten Gradienten und wird erneut stimuliert. Wiederholungen dieser Abfolge navigieren die Zelle schließlich zur Lockstoff-Quelle. (Nähere Erläuterung siehe Text)

Eine wichtige Größe bei der Richtungsfindung der Spermienzelle ist der Austritts-Winkel, mit dem das Spermium die Kreisbahn verlässt. Ist der „turn“ in der Trajektorie zu kurz oder zu lang, d.h. ist die Krümmung zu hoch oder zu niedrig, schwimmt die Spermienzelle im darauffolgenden „run“ in eine falsche Richtung. Das bedeutet, dass die Verhaltensantwort dem Stimulus angepasst sein muss. Eine vorläufige Analyse dieses Aspekts ist in Abb. 4.2 dargestellt. Die Überlagerung der ersten „turns“ in der Trajektorie nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP zeigt, dass Spermien in einem mittleren Austritts-Winkel θ von $318^\circ \pm 40^\circ$ ($n = 41$) ihre Kreisbahn verlassen. Das bedeutet, dass die Spermien nach Stimulation ihre Kreisbahn in einer bevorzugten Richtung verlassen. Die Verteilung der Winkelwerte repräsentiert die Variabilität zwischen verschiedenen Spermienzellen. Die Abstimmung zwischen der Verzögerungszeit des „turn“ und dem Austritts-Winkel θ ist entscheidend dafür, ob der „turn and run“ in die richtige Richtung führt. Fällt der Austritts-Winkel so aus, dass im Gradienten der „run“ in Richtung Quelle zeigt, würden sich die Spermien der Lockstoff-Quelle in epizykloiden Kreisen nähern, deren Mittelpunkte auf einer geraden Linie zur Quelle verlaufen. Ist der Austritts-Winkel größer oder kleiner, nähern sich die Spermien in epizykloiden Kreisen, deren Mittelpunkte auf einer gekrümmten Linie zur Quelle verlaufen (siehe Ergebnisse Abschnitt 3.1.3).

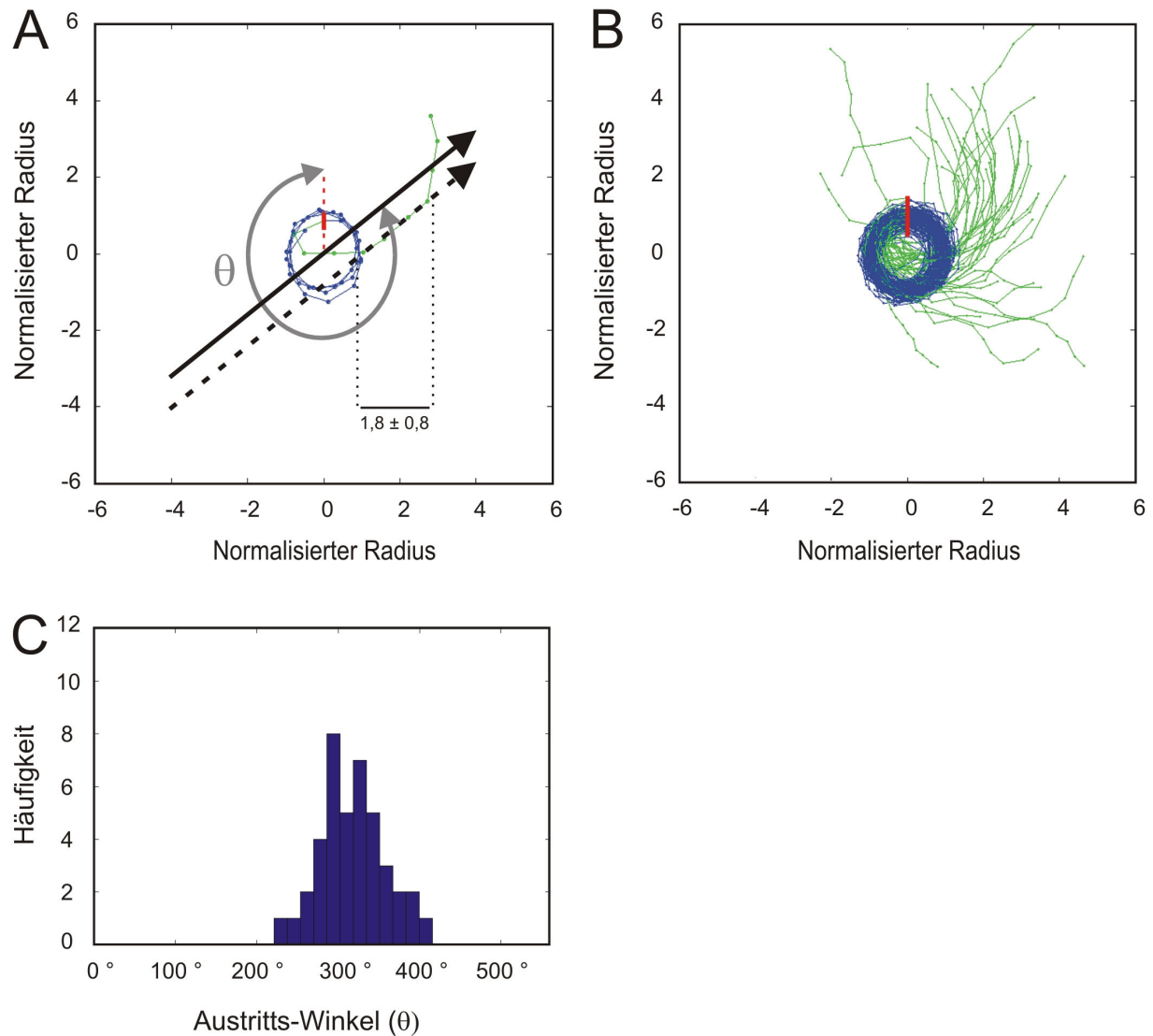


Abbildung 4.2: Erste Verhaltensantwort von *A. punctulata* Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. (A) Darstellung zur Bestimmung des Austritts-Winkels. Die Schwimm-Trajektorien wurden gespiegelt, damit alle Spermien die gleiche Schwimmrichtung besitzen (CCW). Die Radien wurden normiert, indem sie durch den mittleren Radius dividiert wurden. Die Trajektorien wurden dann rotiert, so dass die Zeitpunkte der UV-Blitze übereinander lagen. Entlang eines Fensters von $1,8 \pm 0,8$ Radien (Balken) wurde der Median der Trajektorie-Tangente bestimmt (gestrichelter Pfeil). Die Tangente wurde parallel verschoben, so dass sie durch den Mittelpunkt der Kreisbahn verläuft (schwarzer Pfeil). Der Zeitpunkt des Blitzes wurde als 0° definiert. Der Austritts-Winkel θ wurde in Schwimmrichtung der Spermienzelle zwischen dem Zeitpunkt des Blitzes und der verschobenen Tangente bestimmt (grauer Pfeil). **(B)** Überlagerte Trajektorien von 41 Spermienzellen vor (blau) und nach (grün) der intrazellulären Freisetzung von cGMP (rot). Abgebildet ist nur der erste „turn“. **(C)** Histogramm des Austritts-Winkels.

Nach Stimulation mit cGMP ist die Trajektorie von mehreren „turn and run“-Abschnitten gekennzeichnet. Aus der Wiederholung von „turn and run“-Abschnitten lässt sich schlussfolgern, dass sich die $[Ca^{2+}]_i$ ebenfalls pulsartig ändert, d.h. $[Ca^{2+}]_i$ oszilliert. Dies wird durch die Fluoreszenz-mikroskopischen Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ bestätigt. Wird cGMP freigesetzt, kommt es zu einer Folge von Ca^{2+} -Spikes. Diese Ca^{2+} -Spikes treten in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen auf und ähneln sich in ihrer Größe. Die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen im Flagellum beträgt $1,3 \pm 0,4$ Hz ($n = 8$) (siehe Ergebnisse Tab. 3.1). Wood et al. (2005) beobachten keine Ca^{2+} -Oszillationen nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP in *S. purpuratus* Spermien. Es wurde lediglich eine einzige transiente Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, die relativ langsam verläuft, beobachtet. Der Widerspruch könnte folgendermaßen erklärt werden: im Vergleich zu meiner Arbeit verwendeten Wood et al. eine andere cGMP *caged*-Verbindung (Bhc-cGMP/Ac). Es ist möglich, dass intrazellulär weniger cGMP freigesetzt wurde, wodurch nur ein Ca^{2+} -Spike ausgelöst wird. In seltenen Fällen wurde in Messungen an *A. punctulata* Spermien beobachtet, dass die Spermien mit einem „turn and run“-Ereignis, das wahrscheinlich durch einen einzigen Ca^{2+} -Spike ausgelöst wurde, aus dem Bildfeld schwammen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass diese Spermien ausserhalb des Bildfeldes noch weitere „turn and run“-Abschnitte zeigen. In diesen Spermien wäre die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes kleiner als die Frequenz der Spermien die mehrere „turn and run“-Abschnitte zeigen.

Wenn die Abstimmung zwischen der Verzögerungszeit und dem Austritts-Winkel θ die Richtung des „turn and run“ bestimmt, sollte eine Aneinanderreihung von „turn and run“-Abschnitten, ausgelöst durch Ca^{2+} -Oszillationen, die Spermienzelle in eine bevorzugte Richtung lenken. Eine vorläufige Analyse dieser Hypothese ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Überlagerung der Schwimmtrajektorien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP zeigte, dass sich die Kreise der Spermien nach einer Stimulation im Mittel um 151 ± 85 μm , d.h. das 2,7-fache des mittleren Radius von ihrem Anfangsskreis in eine Richtung verschieben. Der gemittelte Summenvektor zeigt eine Richtungsverschiebung von 352° an. Die Breite der Winkelverteilung wird auf die Variabilität zwischen verschiedenen Spermienzellen zurückgeführt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Ca^{2+} -Oszillation mit der Kreisfrequenz der Spermien synchronisiert sein muss, damit die Spermien ein solches gerichtetes Verhalten zeigen. Die Stimulation mit Resact (homogene Beleuchtung) löst eine ähnliche Oszillation von Ca^{2+} -Spikes aus. Die Frequenz der Resact-induzierten Ca^{2+} -Spikes von $1,8 \pm 0,5$ Hz ($n = 8$) (siehe Ergebnisse Tab. 3.3) stimmt im Rahmen der Fehlergrenzen gut mit der Frequenz der cGMP-induzierten Ca^{2+} -Spikes von $1,3 \pm 0,4$ (siehe Ergebnisse Tab.

3.1) überein. Interessanterweise stimmt auch die mittlere Kreisfrequenz von $1,24 \pm 0,12$ (berechnet nach $f = v / 2\pi r$, wobei f die Kreisfrequenz, v die mittlere Geschwindigkeit von $218 \pm 30 \mu\text{m s}^{-1}$ und r der mittleren Radius von $28 \pm 6,3 \mu\text{m}$ ist; $n = 163$) gut mit der Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen überein. Setzt man die Frequenz der Resact-induzierten Ca^{2+} -Oszillation ins Verhältnis zur Kreisfrequenz so ergibt sich ein Wert von 1,45.

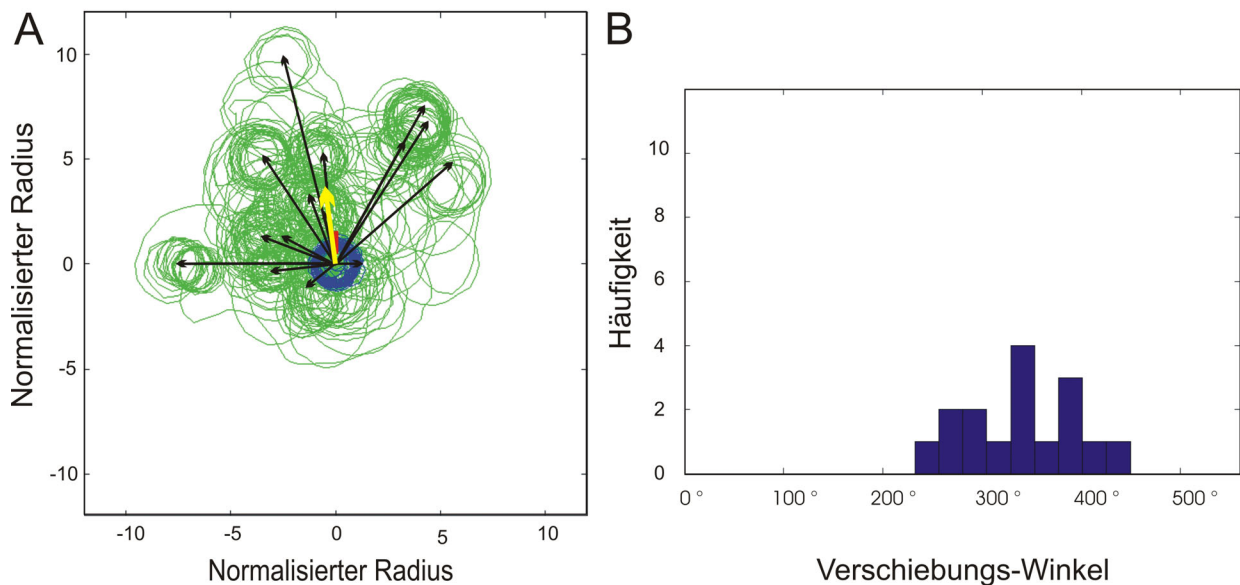


Abbildung 4.3: Verschiebung der Kreisbahnen von *A. punctulata* Spermien nach intrazellulärer Freisetzung von cGMP durch einen UV-Blitz. (A) Überlagerte Trajektorien von 16 Spermienzellen vor (blau) und nach (grün) der intrazellulären Freisetzung von cGMP (rot). Die Trajektorien wurden gespiegelt, damit alle Spermien die gleiche Schwimmrichtung besitzen (CCW). Danach wurden die Trajektorien rotiert, so dass die Koordinaten der Zeitpunkte der UV-Blitze übereinander lagen. Für jede Trajektorie wurde ein Verschiebungsvektor (schwarze Pfeile) bestimmt, der vom Mittelpunkt des Startkreises zum Mittelpunkt des Endkreises zeigt. Der gelbe Pfeil ist der gemittelte Summenvektor der Verschiebungs-Vektoren. **(B)** Histogramm des Verschiebungs-Winkels.

Wenn davon ausgegangen wird, dass durch eine Stimulation der Spermien Ca^{2+} -Oszillationen ausgelöst werden, muss die Kontrolle der gerichteten Bewegung im Gradienten durch eine Modulation dieser Ca^{2+} -Oszillation erfolgen.

4.2 Ca^{2+} -Dynamik und Schwimmverhalten im Gradienten

Spermien, die sich in einem Gradienten in epizykloid-artigen Bewegungen der Lockstoff-Quelle nähern, werden mit einer periodisch-zunehmenden Lockstoff-Konzentration stimuliert. Diese periodisch-zunehmende Änderung spiegelt sich in der Stimulus-Funktion wider (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.2.7). Das Muster der ausgelösten Ca^{2+} -Oszillationen im Gradienten war komplexer als nach der intrazellulären Freisetzung von cGMP. Die cGMP-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen hatten vergleichbar große Amplituden und die einzelnen Spikes traten in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen auf. Im Vergleich dazu wurden durch die Stimulation von Spermien im Gradienten Ca^{2+} -Spikes ausgelöst, deren Amplitude im Laufe der Zeit kleiner wurde. Die Ca^{2+} -Spikes wurden kleiner, je näher die Spermien dem Maximum des Gradienten kamen. Die Abnahme der Amplituden der Ca^{2+} -Spikes kann vermutlich auf adaptative Prozesse zurückgeführt werden. Auch traten die Ca^{2+} -Spikes im Gradienten in weniger regelmäßigen Abständen auf. Es scheint, als würde die Stimulation im Gradienten die zeitliche Abfolge der Ca^{2+} -Spikes beeinflussen. Ein Zusammenhang zwischen der Ca^{2+} -Oszillation und der Stimulation im Gradienten, d.h. der Stimulus-Funktion, war erkennbar (siehe Ergebnisse Abb. 3.15 A). Nach einem Maximum der Stimulus-Funktion wurde ein Ca^{2+} -Spike ausgelöst, der zeitlich in einem Minimum der Stimulus-Funktion auftrat. In anderen Worten, es trat immer nur dann ein Ca^{2+} -Spike gefolgt von einem „turn“ auf, wenn die Spermienzelle auf ihrer Kreisbahn den Gradienten „abwärts“ schwamm. Diese Beobachtung erklärt das „Rätsel“ im chemotaktischen Modell von Cook et al. (1994), dass Spermien mit einer Verhaltensänderung reagieren, wenn sie den Gradienten „abwärts“ schwimmen. Es wurde nicht immer ein Ca^{2+} -Spike in einem Minimum beobachtet. Wahrscheinlich waren manche Ca^{2+} -Signale so gering, dass sie unter die Detektionsgrenze fielen. Auch waren die Ca^{2+} -Oszillationen im Gradienten komplexer und die Zuordnung der Ca^{2+} -Spikes zu einem Minimum war nicht immer eindeutig. Um eine Beziehung zwischen der Stimulus-Funktion und den Ca^{2+} -Spikes statistisch zu erfassen, wurde eine Kreuzkorrelations-Analyse durchgeführt (siehe Ergebnisse Abschnitt 3.2.2) aus der die Phasenverschiebung zwischen der Stimulus-Funktion und den Ca^{2+} -Oszillationen und somit die Verzögerungszeit des „turns“ bestimmt wurde. Die Erzeugung des Gradienten durch Freisetzung von Resact aus *caged* Resact war mit einer Stufenerhöhung in der Resact-Konzentration verbunden (siehe Ergebnisse 3.2.2). Das bedeutet, dass Spermien, die sich im Bildfeld befanden, zum einen auf die Stufenerhöhung und zum anderen auf den Gradienten, der auf dieser Erhöhung erzeugt wurde, reagierten. Durch die Stufenerhöhung wurde eine Folge von Ca^{2+} -Spikes ausgelöst,

die möglicherweise nicht auf die Stimulation der Spermienzelle im Gradienten zurückzuführen ist. Dadurch könnte die Kreuzkorrelations-Analyse gestört und der Wert für die Verzögerungszeit verfälscht werden. Deshalb wurde die Analyse sowohl mit als auch unter Ausschluss der ersten Ca^{2+} -Spikes durchgeführt. Die weitgehend übereinstimmenden Ergebnisse zeigen, dass die durch die Stufenerhöhung ausgelösten Ca^{2+} -Spikes die Analyse wenig beeinflussen. Eine Erklärung dafür ist, dass die ersten Ca^{2+} -Spikes mit der Kreisfrequenz der Spermien synchronisiert sind. Dies ging ja bereits aus der Übereinstimmung der Kreisfrequenz mit der Frequenz der cGMP-bzw. Resact-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen hervor (siehe oben). Tatsächlich liegen die Verzögerungszeiten mit und ohne die ersten Ca^{2+} -Spikes (ca. 250 - 400 ms) in der Größenordnung der halben Umlaufzeit eines Spermiums (403 ± 38 ms; $n = 163$). Anhand der mittleren Verzögerungszeit des „turn“ wurde ein mittlerer Verzögerungs-Winkel ϕ von $156^\circ \pm 43^\circ$ bestimmt. Das heisst, dass die Spermien nach Erreichen eines Maximums der Stimulation noch ca. 160° auf ihrer Kreisbahn schwimmen bevor ein „turn“ erfolgt (siehe auch Abb. 4.1). Das „Rätsel“ wurde dadurch gelöst, dass gezeigt wurde, dass Spermien im Gradienten auf einen Ca^{2+} -Spitze, ausgelöst durch eine erhöhte Lockstoffkonzentration, erst nach ca. 300 ms Verzögerungszeit mit einem „turn and run“-Verhalten reagieren.

Eine essentielle Eigenschaft der Bakterien-Chemotaxis ist, dass Bakterien über den Besetzungsgrad ihrer Lockstoff-Rezeptoren sowohl einen abnehmenden als auch einen zunehmenden Gradienten detektieren können (Eisenbach et al., 2004). In der *Sampling*-Phase, d.h. solange die Spermienzelle den Gradienten „aufwärts“ schwimmt, wird die Zelle mit einer erhöhten Lockstoff-Konzentration stimuliert. Nach einer Verzögerungszeit von ca. 300 ms und während die Spermienzelle bereits den Gradienten „abwärts“ schwimmt, reagiert die Zelle mit einem „turn and run“. Durch den „run“ wird die Kreisbahn der Spermienzelle in Richtung Lockstoff-Quelle versetzt. Während des „run“ setzt eine neue *Sampling*-Phase ein. Wiederholungen dieser Abfolge navigieren die Zelle zum Ziel.

Unser Modell für die Chemotaxis kommt ohne die Annahme aus, dass Spermienzellen auf abnehmende Konzentrationen in einem Gradienten reagieren. Außerdem ist eine *A. punctulata* Spermienzelle wahrscheinlich gar nicht in der Lage, eine abnehmende Konzentration im Gradienten zu detektieren: *A. punctulata* Spermien sind extrem empfindlich und reagieren schon auf picomolare Resact-Konzentrationen. In Anbetracht der extrem hohen Bindungs-Affinität (der K_D -Wert des verwandten Peptids Speract liegt bei wenigen pM; (Nishigaki & Darszon, 2000)) ist die Bindung von Resact an den Rezeptor nahezu irreversibel (Kaupp et al., 2003). Deshalb dissoziiert gebundenes Resact nach der *Sampling*-Phase von ca.

400 ms (Umlaufzeit für eine halbe Kreisbahn) wahrscheinlich nicht so schnell vom Rezeptor, wenn die Konzentration abnimmt. Somit kann der Besetzungsgrad der Rezeptoren nicht neu angepasst werden, wenn die Spermienzelle den Gradienten „abwärts“ schwimmt.

Eine wichtige Frage ist, wie Spermien einen Lockstoff-Gradienten wahrnehmen. Detektieren Spermien unterschiedliche Konzentrationen durch den Vergleich der Konzentration an zwei verschiedenen Stellen der Zelle oder vergleichen sie die Konzentrationen an zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten? In anderen Worten, erfolgt die Detektion des Gradienten räumlich oder zeitlich? Bei Bakterien konnten Macnab und Koshland (1972) durch ein einfaches Experiment zeigen, dass Bakterien einen Gradienten zeitlich wahrnehmen. In ihrer Arbeit wurde eine Bakterienlösung schnell mit einer Lockstoff-Lösung gemischt, so dass in der Mischkammer der Lockstoff homogen verteilt war. Danach wurde das Schwimmverhalten der Bakterien innerhalb von 0,5 s beobachtet. Würden Bakterien einen Gradienten räumlich wahrnehmen, sollten sie nach dem Mischen kein verändertes Verhalten zeigen, da die Lockstoff-Konzentration an allen Enden der Zelle gleich ist. Da die homogene Erhöhung der Lockstoff-Konzentration aber eine Verhaltensänderung auslöste (die Bakterien zeigten eine niedrigere Taumelfrequenz; siehe Einleitung Abschnitt 1.2.1), schlossen Macnab und Koshland daraus, dass die Wahrnehmung zeitlich erfolgt. Das heisst, dass die Bakterien die Konzentration vor und nach dem Mischen vergleichen. Anschaulich wie in dem Experiment von Macnab und Koshland wird in dieser Arbeit gezeigt, dass die Wahrnehmung bei Spermien ebenfalls zeitlich erfolgt. Wenn *A. punctulata* Spermien in einer Lösung mit *caged* Resact schwimmen, zeigen sie ihr Normalverhalten, d.h. sie schwimmen in Kreisbahnen. Durch einen UV-Blitz wird Resact im gesamten Bildfeld freigesetzt, d.h. Resact ist homogen verteilt und es entsteht kein Gradient. Erfolgte die Detektion des Gradienten räumlich, sollte durch die homogene Erhöhung der Resact-Konzentration keine Verhaltensänderung ausgelöst werden – die Konzentration ist an allen Enden der Zelle gleich. Die Spermien reagieren aber: nach dem UV-Blitz verlassen die Spermien die Kreisbahn und die Schwimmtrajektorie ist durch mehrere „turn and run“-Abschnitte charakterisiert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Spermien, wie in Bakterien, einen Gradienten zeitlich wahrnehmen. Die Spermien vergleichen die Resact-Konzentration vor und nach der Freisetzung durch den UV-Blitz. Da die Spermien in einer Kreisbahn schwimmen und sie durch erhöhte Lockstoff-Konzentration stimuliert werden, wenn sie den Gradienten „aufwärts“ schwimmen, muss die Detektion des Gradienten während der *Sampling*-Phase erfolgen. Das bedeutet, dass der räumliche Konzentrations-Unterschied dadurch wahrgenommen wird, dass die Konzentration an verschiedenen aufeinanderfolgenden Zeitpunkten der *Sampling-Phase* verglichen wird.

Die maximale Lockstoff-Empfindlichkeit einer Spermienzelle während einer *Sampling*-Phase kann wie folgt abgeschätzt werden. Die Anzahl der Lockstoff-Moleküle, die auf ein ellipsoides Flagellum treffen, kann nach Berg (1993) folgendermaßen berechnet werden: $N = L4\pi Dac/\ln(2a/b)$, wobei L die Avogadro-Konstante, D der Diffusions-Koeffizient von Resact, c die Resact-Konzentration und a und b die Länge bzw. der Durchmesser des Flagellums sind. Für $D = 3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ }\mu\text{m}$, $b = 0.3 \text{ }\mu\text{m}$ und $c = 1 \text{ pM}$ ist $N = 18 \text{ Moleküle s}^{-1}$. Werden der niedrige K_D -Wert und vor allem eine hohe Dichte der Lockstoff-Rezeptoren auf der Flagellenoberfläche (mehrere 10.000 Rezeptoren/ Flagellum; Shimomura & Garbers, 1986; Shimizu et al., 1994; Nishigaki & Darszon, 2000) angenommen, ist der Bindungsprozess weit entfernt vom chemischen Gleichgewicht der Reaktion. In der kurzen Dauer der *Sampling*-Phase, in der die Spermienzelle eine Änderung der Konzentration detektiert, wird das chemische Gleichgewicht nicht erreicht. Eine Schlussfolgerung dessen ist, dass Spermien eine relative Änderung (Anzahl der Bindungsereignisse der auftreffenden Lockstoff-Moleküle) und nicht die absolute Änderung der Lockstoff-Konzentration detektieren. Die Anzahl der Bindungsereignisse ist abhängig von der Rezeptordichte im Flagellum und von den sterischen Anforderungen des Bindungsprozesses. Aufgrund dessen wird die Anzahl der Bindungsereignisse geringer sein ($\sim 9 \text{ Moleküle s}^{-1}$). Die Empfindlichkeit der Zelle ist begrenzt durch die Anzahl der Moleküle, die während der *Sampling*-Phase an einen Rezeptor binden. Diese Anzahl wird durch die kurze Dauer der *Sampling*-Phase von nur 200-500 ms weiter verringert (wird von 500 ms ausgegangen so entspricht dies ca. 4 Molekülen pro *Sampling*-Phase). Die Standardabweichung von 4 Molekülen ist $\sqrt{4}$ („Poisson-Rauschen“). Das entspricht einem Signal-/Rausch-Verhältnis von: $(4/\sqrt{4}) = 2$ und liegt somit an der Auflösungsgrenze. Die untere Empfindlichkeitsgrenze, um eine Verhaltensantwort auszulösen, muss daher bei wenigen Picomolar liegen.

4.3 Zusammenhang zwischen der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Verhaltensantwort

Nach Brokaw (1979) führt eine hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu einer hohen Krümmung und eine niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu einer geringeren Krümmung der Trajektorie. Das heisst, dass die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei einem „run“ unter die Ca^{2+} -Ruhekonzentration sinken müsste. Dies ist aber nicht der Fall: während eines „runs“ liegt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ noch deutlich über der Ca^{2+} -Ruhekonzentration (siehe 3.2.). Es scheint deshalb keine einfache Beziehung zwischen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Krümmung der Trajektorie zu geben. Womöglich wird mit einem Ca^{2+} -Spike ein Prozess ausgelöst, der die Krümmung der Trajektorie erniedrigt, obwohl die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ noch erhöht ist. Es wurde gezeigt, dass durch die Stimulation der Spermien mit cGMP ein chemokinetischer Effekt auftritt, der zu einer Abnahme in der Krümmung der Trajektorie führt (siehe Ergebnisse 3.1.2). Eventuell könnte diese cGMP-induzierte Chemokinesis für die Abnahme der Krümmung nach einem Ca^{2+} -Spike verantwortlich sein. Auch kann die Verhaltensantwort während einer Folge von Ca^{2+} -Spikes „adaptieren“. Dies ist erkennbar in den cGMP-Experimenten mit *A. punctulata* Spermien (siehe Ergebnisse Abschnitt 3.2.1). Obwohl die Ca^{2+} -Spikes vergleichbar große Amplituden besitzen (siehe Ergebnisse Abb. 3.9), fällt die Verhaltensantwort unterschiedlich stark aus (siehe Ergebnisse Abb. 3.8 B). Die durch die ersten beiden Ca^{2+} -Spikes ausgelösten Änderungen der Krümmung sind ca. 5-mal größer als diejenigen, die durch die letzten beiden Ca^{2+} -Spikes ausgelöst wurden. In anderen Worten: während die ersten Ca^{2+} -Spikes eine starke Krümmung in der Trajektorie auslösen, erfolgt durch die beiden letzten Ca^{2+} -Spikes lediglich eine leichte Richtungsänderung. Ebenso scheint die Folge von Ca^{2+} -Spikes in einem Gradienten durch die anhaltende Stimulation zu adaptieren (siehe Ergebnisse Abschnitt 3.2.2). Der Punkt, an dem die Adaptation ansetzt, ist unbekannt. Die adaptativen Änderungen könnten an verschiedenen Stellen entlang des cGMP-Signalweges oder direkt an den Motorproteinen des Axonems ansetzen. Adaptive Mechanismen könnten entweder direkt von Ca^{2+} oder von Ca^{2+} -unabhängigen Prozessen aktiviert werden. Die Adaptation ist ein essentieller Prozess während der Chemotaxis. Die Zelle entgeht dadurch der Sättigung und ist dadurch in der Lage, selbst bei hohen Konzentrationen Änderungen wahrzunehmen. Ein umfassendes Modell der Chemotaxis muss die Wechselwirkung zwischen Stimulation und Adaptation einer Spermienzelle im Gradienten mit einbeziehen.

4.4 Evolutionäre Konservierung des chemotaktischen Signalweges in *A. punctulata* und *A. amurensis* Spermien

4.4.1 Identifizierung von Asterosap als chemotaktisch-aktives Peptid

Die genaue Funktion von Asterosap ist noch unklar. In hohen Konzentrationen (1 μM) soll Asterosap als Kofaktor für die akrosomale Exozytose dienen (Nishigaki et al., 1996). In einer anderen Arbeit (Matsumoto et al., 2003) wurde gezeigt, dass *A. amurensis* Spermien, wie *A. punctulata* Spermien, auf Stimulation mit picomolaren Konzentrationen des Lockstoffes mit einem Ca^{2+} -Einstrom antworten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich Spermien des Seesterns *A. amurensis* einer Pipettenspitze, die eine Asterosap-Lösung enthielt, in epizykloid-artigen Bewegungen nähern und dort akkumulieren. Asterosap weist auch eine hohe Sequenzähnlichkeit (72 % Identität) mit der N-terminalen Region des Peptids „Startrak“ auf, das aus Eizellen des Seesterns *Pycnopodia helianthoides* isoliert wurde (Miller & Vogt, 1996). Ein synthetisiertes Peptid, das die N-terminale Sequenz von „Startrak“ (Aminosäurepositionen 3-34) enthält, ist für verschiedene Echinoid-Spezies chemotaktisch-aktiv. Diese Ergebnisse identifizieren Asterosap als Lockstoff-Peptid des Seesterns *A. amurensis*. Es ist nicht auszuschließen, dass Asterosap oder auch Resact bei niedrigen Konzentrationen als Lockstoffe und in hohen Konzentrationen als Kofaktoren für die akrosomale Exozytose dienen. Durch Stimulation mit cGMP wird ein chemokinetischer Effekt auf die Spermien ausgelöst (siehe Ergebnisse Abschnitt 3.1.2). Demnach wäre es denkbar, dass durch Stimulation mit hohen Lockstoff-Konzentrationen eine starke Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration zur Hyperaktivierung der Spermien führt (siehe Einleitung Abb. 1.1).

4.4.2 Vergleich der Chemotaxis zwischen *A. punctulata* und *A. amurensis* Spermien

Das chemotaktische Verhalten von Spermien des Seeigels *A. punctulata* und Spermien des Seesterns *A. amurensis* ist in allen untersuchten Aspekten ähnlich. Abgesehen von wenigen quantitativen Abweichungen unterscheiden sich die zellulären Ereignisse der Chemotaxis in Seeigel- und Seestern-Spermien nicht grundlegend. Die Ähnlichkeit bezüglich 1. der Ca^{2+} -Dynamik, 2. der Verhaltensantwort und 3. des Schwimmverhaltens in einem Gradienten deuten darauf hin, dass sich der chemotaktische cGMP-vermittelte Signalweg in diesen zwei

Spezies, die vor etwa 500 Millionen Jahren divergierten (Smith, 1988; Wada & Satoh, 1994), konserviert ist.

Im Unterschied zu *A. punctulata* Spermien wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration in *A. amurensis* Spermien durch die Stimulation mit Asterosap nur unwesentlich erhöht (Matsumoto et al., 2003). Die intrazelluläre Freisetzung von cAMP löst weder eine Verhaltensantwort noch Ca^{2+} -Spikes im Flagellum aus (siehe Ergebnisse Abschnitt 3.2.2, Abb. 3.8). Demnach scheint cAMP keine essentielle Rolle als Botenstoff im chemotaktischen Signalweg in *A. amurensis* Spermien einzunehmen. Der Vergleich der Chemotaxis zwischen Seeigel- und Seestern-Spermien könnte deshalb helfen, gegensätzliche Ansichten über den Signalweg in der Chemotaxis von Seeigeln zu klären. In einem Modell führt die Stimulation mit Lockstoff über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (durch eine Erhöhung des pH-Wertes) zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen (Cook et al., 1994; zur Übersicht: Darszon et al., 1999, 2001). In einer anderen Untersuchung wurde angenommen, dass eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Ca^{2+} -Konzentration in Köpfen von immobilisierten Spermien ändert (Wood et al., 2003). Ausgehend von Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wird aber angenommen, dass cGMP direkt oder indirekt für den Ca^{2+} -Einstrom in Seeigel-Spermien verantwortlich ist (Kaupp et al., 2003). Aufgrund der Ähnlichkeiten im chemotaktischen Signalweg der beiden Spezies Seeigel und Seestern könnte darauf geschlossen werden, dass cAMP auch in der Chemotaxis der Seeigel keine essentielle Rolle spielt. Der Ca^{2+} -Einstrom in *A. punctulata* Spermien zeigt zwei kinetische Komponenten – einen frühen und einen späten Einstrom (Kaupp et al., 2003). Während der frühe Ca^{2+} -Einstrom von einem starken Anstieg der cGMP-Konzentration ausgelöst wird, ist der Auslöser für den späten Ca^{2+} -Einstrom nicht bekannt. Es könnte sein, dass ein Zusammenhang zwischen dem langsamen und kleineren Anstieg der cAMP-Konzentration und dem späten Ca^{2+} -Einstrom besteht (Kaupp et al., 2003). Im Gegensatz zum späten Ca^{2+} -Einstrom findet der frühe Ca^{2+} -Einstrom zeitgleich mit der Resact-induzierten Änderung des Schwimmverhaltens statt. Der frühe Ca^{2+} -Einstrom scheint daher die entscheidende Reaktion in der Signalkette der Chemotaxis darzustellen. Um die genaue Funktion der beiden Ca^{2+} -Einströme zu klären, müssen die beteiligten Komponenten des chemotaktischen Signalweges identifiziert werden.

4.5 Identifizierung eines cGMP-aktivierten Ionenkanals in Seeigelspermien

Es wird angenommen, dass der Ca^{2+} -Einstrom in *A. punctulata* Spermien direkt oder indirekt von cGMP vermittelt wird. Die Vermutung liegt nahe, dass ein CNG-Kanal am Ca^{2+} -Einstrom beteiligt ist. Ein CNG-Kanal könnte am Anfang der Signalkette als K^{+} -selektiver Kanal an der Hyperpolarisation beteiligt sein oder er könnte am Ende der Signalkette direkt für den Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich sein. Bei der Durchmusterung von zwei *A. punctulata* Hoden cDNA-Bibliotheken mit einer CNG-spezifischen Sonde konnte kein Gen, das für einen solchen Kanal kodiert, gefunden werden. Lediglich ein Ortholog eines HCN-Kanals aus *S. purpuratus* (SpIH) konnte identifiziert werden. Eine *Southern Blot* Analyse genomischer *A. punctulata* DNA zeigte, dass ein zu CNG-Kanälen homologes Gen im Genom existiert. Ob das Gen gewebspezifisch in den Hoden exprimiert wird, müsste noch durch eine *Northern Blot* Analyse überprüft werden. In einer Zusammenarbeit mit Dr. E. Krause im FMP, Berlin, wird versucht, Proteine des Flagellums zu identifizieren. Hierzu wurden Flagellenproteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und einzelne Banden mittels Massenspektrometrie analysiert. In diesen Untersuchungen ist bisher neben prominenten Flagellenproteinen, wie der Rezeptor-GC, der Kreatin-Kinase und Tubulin, auch das SpIH-Ortholog (ApIH) identifiziert worden. Andere Kanalproteine wurden bisher nicht gefunden. Die genaue Funktion des SpIH-Kanals (und somit auch seines Orthologs ApIH) ist noch unbekannt. Von HCN-Kanälen weiss man, dass sie an der Erzeugung und Regulation rhythmischer Aktivierungsmuster beteiligt sind. Den Ca^{2+} -Oszillationen im Flagellum könnten rhythmische Änderungen der Membranspannung vorausgehen, an deren Entstehung ein HCN-Kanal beteiligt sein könnte. Die Ca^{2+} -Spikes würden dann durch das Öffnen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen entstehen. Eine Hyperpolarisation, durch die HCN-Kanäle aktiviert werden, könnte durch die Öffnung eines cGMP-aktivierten K^{+} -Kanals erfolgen. Diese Hypothese lässt sich nur klären, wenn ein entsprechender K^{+} -selektiver CNG-Kanal und der entsprechende spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal in Spermien identifiziert und charakterisiert werden.

4.4 Ausblick

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben einige Grundlagen zum Verständnis der Chemotaxis von Spermien mariner Invertebraten geliefert. Anhand der Beobachtung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und des Schwimmverhaltens konnte ein Modell zur Spermien-Chemotaxis entwickelt werden. Durch den Einsatz von Spannungs-sensitiven Farbstoffen könnte die Funktion von weiteren für die Chemotaxis relevanten Ereignissen aufgeklärt werden. Für ein umfassendes Modell der Chemotaxis muss das Wissen um die beteiligten Komponenten des Signalweges erweitert werden. Das heisst, dass neben den beteiligten Kanalproteinen auch noch weitere Proteine des Signalweges molekular identifiziert werden müssen.

Während immer mehr Erkenntnisse über die Spermien-Chemotaxis des Modellsystems Seeigel gewonnen werden, ist nach wie vor wenig über die Spermien-Chemotaxis von Säugetieren bekannt (Eisenbach, 2004; Eisenbach et al., 2004). Weder die chemische Natur des Lockstoffs noch die Lockstoffrezeptoren sind klar identifiziert worden. Jedoch scheinen auch bei der Chemotaxis von Säugetier-Spermien zyklische Nukleotide und Ca^{2+} eine wichtige Rolle zu spielen. Die Anwendung der in dieser Arbeit entwickelten Mikroskopie-Methoden zusammen mit der Verwendung von *caged*-Verbindungen an Säugetier-Spermien könnten grundlegende Erkenntnisse zur Chemotaxis von Säugetier-Spermien liefern.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe simultan das Schwimmverhalten und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von schwimmenden Spermien des Seeigels *A. punctulata* und des Seesterns *A. amurensis* beobachtet und analysiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die extrazelluläre Stimulation von *A. punctulata* Spermien mit dem Lockstoff Resact als auch die intrazelluläre Freisetzung von cGMP eine Folge von Ca^{2+} -Spikes im Flagellum auslösen. Ein Ca^{2+} -Spike löst eine kombinierte Verhaltensantwort aus. Diese Verhaltensantwort besteht aus einer Biegung in der Schwimmtrajektorie gefolgt von einem Abschnitt geraden Schwimmens („turn and run“). Die Beobachtung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von schwimmenden Spermien in einem definierten Lockstoff-Gradienten zeigte, dass die induzierten Ca^{2+} -Spikes und die Stimulus-Funktion synchronisiert sind. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die zeitliche Abfolge von Ca^{2+} -Spikes das Schwimmverhalten steuert. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde ein Modell zur Chemotaxis von Spermien erstellt, das erläutert wie Spermien sich in einem Gradienten orientieren.

Das Eizellpeptid des Seesterns *A. amurensis* Asterosap wurde als Lockstoff identifiziert. Der Vergleich der Chemotaxis zwischen Spermien des Seeigels *A. punctulata* und des Seesterns *A. amurensis* zeigte, dass das chemotaktische Verhalten beider Spezies in Bezug auf 1. die cGMP-induzierte Ca^{2+} -Dynamik im Flagellum, 2. die durch Ca^{2+} ausgelöste Verhaltensantwort und 3. das Schwimmverhalten in einem Lockstoff-Gradienten vergleichbar ist. Die Schlussfolgerung aus diesem Vergleich ist, dass cAMP weder bei der Chemotaxis von Spermien des Seesterns noch von Spermien des Seeigels eine essentielle Rolle spielt. Der cGMP-vermittelte chemotaktische Signalweg ist demnach in zwei Spezies konserviert geblieben, die vor ca. 500 Millionen Jahren divergierten.

Ein cGMP-aktivierter Ionenkanal, der für eine Hyperpolarisation oder für einen Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich sein könnte, konnte in *A. punctulata* bisher nicht identifiziert werden. Womöglich spielen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, die bisher nur mit der akrosomalen Exozytose in Verbindung gebracht wurden, doch eine bedeutsame Rolle für den Ca^{2+} -Einstrom in der Chemotaxis von Spermien.

6 Literatur

- Adler, J. (1978). Chemotaxis in bacteria. Harvey Lect. 72, 195-230.
- Beltrán, C., Darszon, A., Labarca, P., and Liévano, A. (1994). A high-conductance voltage-dependent multistate Ca^{2+} channel found in sea urchin and mouse spermatozoa. FEBS Lett. 338, 23-26.
- Beltrán, C., Zapata, O., and Darszon, A. (1996). Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase. Biochemistry 35, 7591-7598.
- Benton, W.D. and Davis, R.W. (1977). Screening kgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196, 180-182.
- Berg, H.C. (1975). How bacteria swim. Sci. American 233, 36-44.
- Berg, H.C. (1993). Random Walks in Biology. (Princeton, New Jersey: Princeton University Press).
- Berg, H.C. and Brown, D.A. (1972). Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. Nature 239, 500-504.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- Blair, D.F. (1995). How bacteria sense and swim. Annu. Rev. Microbiol. 49, 489-522.
- Brokaw, C.J. (1979). Calcium-induced asymmetrical beating of Triton-demembranated sea urchin sperm flagella. J. Cell Biol. 82, 401-411.
- Bronstein, J.N. and Semendjajew, K.A. (1989). Taschenbuch der Mathematik. (Moskau, Leipzig: Nanka, Teubner).
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. (1987). XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. BioTechniques 5, 376-378.
- Cardullo, R.A., Herrick, S.B., Peterson, M.J., and Dangott, L.J. (1994). Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. Dev. Biol. 162, 600-607.
- Chung, C.Y., Funamoto, S., and Firtel, R.A. (2001). Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. Trends Biochem. Sci. 26, 557-566.
- Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., and 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. and Babcock, D.F. (1993a). Activation of Ca^{2+} permeability by cAMP is coordinated through the pH_i increase induced by speract. *J. Biol. Chem.* 268, 22408-22413.
- Cook, S.P. and Babcock, D.F. (1993b). Selective modulation by cGMP of the K^+ channel activated by speract. *J. Biol. Chem.* 268, 22402-22407.
- Cook, S.P., Brokaw, C.J., Muller, C.H., and 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. In *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*, C. Gagnon, ed. (Boca Raton: CRC Press), pp. 103-135.
- Crenshaw, H.C. (1989). Kinematics of helical motion of microorganisms capable of motion with four degrees of freedom. *Biophys. J.* 56, 1029-1035.
- Dangott, L.J. and Garbers, D.L. (1984). Identification and partial characterization of the receptor for speract. *J. Biol. Chem.* 259, 13712-13716.
- Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T., and Treviño, C.L. (2001). Ion transport in sperm signaling. *Dev. Biol.* 240, 1-14.
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., and Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiol. Rev.* 79, 481-510.
- Djordjevic, S. and Stock, A.M. (1998). Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: Components of a dynamic signaling system. *J. Struct. Biol.* 124, 189-200.
- Eisenbach, M. (2004). Towards understanding the molecular mechanism of sperm chemotaxis. *J. Gen. Physiol.* 124.
- Eisenbach, M. (1990). Functions of flagellar modes of rotation in bacterial motility and chemotaxis. *Mol. Microbiol.* 4, 161-167.
- Eisenbach, M., Lengeler, J.W., Varon, M., Gutnick, D., Meili, R., Firtel, R.A., Segall, J.E., Omann, G.M., Tamada, A., and Murakami, F. (2004). *Chemotaxis*. (London: Imperial College Press).
- Fabro, G., Rovasio, R.A., Civalero, S., Frenkel, A., Caplan, S.R., Eisenbach, M., and Giojalas, L.C. (2002). Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol. Reprod.* 67, 1565-1571.
- Falke, J.J., Bass, R.B., Butler, S.L., Chervitz, S.A., and Danielson, M.A. (1997). The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: A molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 13, 457-512.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.

- Galindo, B.E., Beltrán, C., Cragoe, E.J. Jr., and 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., 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.
- Gauss, R., Seifert, R., and Kaupp, U.B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* *393*, 583-587.
- Gegner, J.A., Graham, D.R., Roth, A.F., and Dahlquist, F.W. (1992). Assembly of an MCP receptor, Che W and kinase Che A complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell* *70*, 975-982.
- Gestwicki, J.E. and Kiessling, L.L. (2002). Inter-receptor communication through arrays of bacterial chemoreceptors. *Nature* *415*, 81-84.
- Giojalas, L.C. and Rovasio, R.A. (1998). Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *Int. J. Androl.* *21*, 201-206.
- Godde, M. Elektrophysiologische Charakterisierung von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen sowie biophysikalische Untersuchungen zur Signaltransduktion in Spermien. 1996. Dissertation, Universität Regensburg.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Goudreau, P.N. and Stock, A.M. (1998). Signal transduction in bacteria: Molecular mechanisms of stimulus-response coupling. *Curr. Opin. Microbiol.* *1*, 160-169.
- Gray, J. (1955). The movement of sea-urchin spermatozoa. *J. Exp. Biol.* *32*, 775-800.
- Hagen, V., Bendig, J., Frings, S., Eckardt, T., Helm, S., Reuter, D., and Kaupp, U.B. (2001). Highly efficient and ultrafast phototriggers for cAMP and cGMP by using long-wavelength UV/Vis-activation. *Angew. Chem. Int. Ed.* *40*, 1046-1048.
- Hagen, V., Frings, S., Bendig, J., Lorenz, D., Wiesner, B., and Kaupp, U.B. (2002). Fluorescence spectroscopic quantification of the release of cyclic nucleotides from photocleavable [Bis(carboxymethoxy)coumarin-4-yl]methyl esters inside cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* *41*, 3625-3628.
- Hansbrough, J.R. and Garbers, D.L. (1981). Speract - Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* *256*, 1447-1452.
- Harper, M.J.K. (1994). Gamete and zygote transport. In *The Physiology of Reproduction*, Vol. 1, E. Knobil and J.D. Neill, eds. (New York: Raven Press), pp. 123-187.
- Haugland, R.P. (2005). *The Handbook- A guide to fluorescent probes and labeling technologies*. Molecular Probes).
- Heery, D.M., Gannon, F., and Powell, R. (1990). A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Gen.* *6*, 173.

- Inaba,K. (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: Molecules for motility and signaling. *Zool. Sci.* 20, 1043-1056.
- Kaupp,U.B. and Seifert,R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* 82, 769-824.
- Kaupp,U.B., Solzin,J., Hildebrand,E., Brown,J.E., Helbig,A., Hagen,V., Beyermann,M., Pampaloni,F., and Weyand,I. (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nature Cell Biology* 5, 109-117.
- Lee,H.C. and 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.
- Levit,M.N., Liu,Y., and Stock,J.B. (1998). Stimulus response coupling in bacterial chemotaxis: Receptor dimers in signalling arrays. *Mol. Microbiol.* 30, 459-466.
- Liévano,A., Vega-Saenz de Miera,E.C., and Darszon,A. (1990). Ca^{2+} channels from sea urchin sperm plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* 95, 273-296.
- Lillie,F.R. (1913). The behavior of the spermatozoa of Nereis and Arbacia with special reference to egg extractives. *J. Exp. Zool.* 14, 515-574.
- Macnab,R.M. (1996). Flagella and motility, in *E.coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington D. C. 145.
- Macnab,R.M. and Koshland,D.E.Jr. (1972). The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2509-2512.
- Manson,M.D., Armitage,J.P., Hoch,J.A., and Macnab,R.M. (1998). Bacterial locomotion and signal transduction. *J. Bacteriol.* 180, 1009-1012.
- Matsui,T., Nishiyama,I., Hino,A., and Hoshi,M. (1986). Induction of the acrosome reaction in starfish. *Develop. Growth & Differ.* 28, 339-348.
- Matsumoto,M., Solzin,J., Helbig,A., Hagen,V., Ueno,S.-I., Kawase,O., Maruyama,Y., Ogiso,M., Godde,M., Minakata,H., Kaupp,U.B., Hoshi,M., and Weyand,I. (2003). A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm. *Dev. Biol.* 260, 314-324.
- Meinkoth,J. and Wahl,G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138, 267-284.
- Miller,R.L. (1985). Sperm chemo-orientation in the metazoa. In *Biology of Fertilization*, Vol. 2: *Biology of the Sperm*, C.B.Metz and A.Monroy, eds. (New York: Academic Press), pp. 275-337.
- 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.

- Milligan,D.L. and Koshland,D.E. (1988). Site-directed cross-linking: Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 263, 6268-6275.
- Mowbray,S.L. and Sandgren,M.O.J. (1998). Chemotaxis receptors: A progress report on structure and function. *J. Struct. Biol.* 124, 257-275.
- Navarro,M.C., Valencia,J., Vasquez,C., Cozar,E., and Villanueva,C. (1998). Crude mare follicular fluid exerts chemotactic effects on stallion spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 33, 321-324.
- 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. and Darszon,A. (2000). Real-time-measurements of the interactions between fluorescent speract and its sperm receptor. *Dev. Biol.* 223, 17-26.
- Nishigaki,T., Wood,C.D., Tatsu,Y., Yumoto,N., Furuta,T., Elias,D., Shiba,K., Baba,S.A., and Darszon,A. (2004). A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca^{2+} before its increase. *Dev. Biol.* 272, 376-388.
- Oliveira,R.G., Tomasi,L., Rovasio,R.A., and 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., and 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. USA* 98, 11205-11210.
- Palazzolo,M.J., Hamilton,B.A., Ding,D.L., Martin,C.H., Mead,D.A., Mierendorf,R.C., Raghavan,K.V., Meyerowitz,E.M., and Lipshitz,H.D. (1990). Phage lambda cDNA cloning vectors for subtractive hybridization, fusion protein synthesis and Cre-loxP automatic plasmid subcloning. *Gene* 88, 25-36.
- Pao,Y.C. (1999). *Engineering Analysis*. (Boca Raton: CRC Press LLC).
- Parkinson,J.S. and Kofoid,E.C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26, 71-112.
- Ralt,D., Goldenberg,M., Fetterolf,P., Thompson,D., Dor,J., Mashiach,S., Garbers,D.L., and 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., and Eisenbach,M. (1994). Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol. Reprod.* 50, 774-785.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

- Savitzky, A. and Golay, M.J.E. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedure. *Anal. Chem.* **36**, 1627-1639.
- Schackmann, R.W. and Chock, P.B. (1986). Alteration of intracellular $[Ca^{2+}]$ in sea urchin sperm by the egg peptide speract. *J. Biol. Chem.* **261**, 8719-8728.
- Schuster, S.C., Swanson, R.V., Alex, L.A., Bourret, R.B., and Simon, M.I. (1993). Assembly and function of a quaternary signal transduction complex monitored by surface plasmon resonance. *Nature* **365**, 343-347.
- Serrano, H., Canchola, E., and Garcia-Suarez, M.D. (2001). Sperm-attracting activity in follicular fluid associated to an 8.6 kDa protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 782-784.
- Shimizu, T., Yoshino, K., and Suzuki, N. (1994). Identification and characterization of putative receptor for sperm-activating peptide I (SAP-I) in spermatozoa in sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Develop. Growth & Differ.* **36**, 209-221.
- Shimizu, T.S., Le Novère, N., Levin, M.D., Beavil, A.J., Sutton, B.J., and Bray, D. (2000). Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis. *Nature Cell Biology* **2**, 792-796.
- Shimomura, H., Dangott, L.J., and Garbers, D.L. (1986). Covalent coupling of a resact analogue to guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **261**, 15778-15782.
- Shimomura, H. and Garbers, D.L. (1986). Differential effects of resact analogues on sperm respiration rates and cyclic nucleotide concentrations. *Biochemistry* **25**, 3405-3410.
- Smith, A.B. (1988). Fossil evidence for the relationships of extant echinoderm classes and their times of divergence. In *Echinoderm Phylogeny and Evolutionary Biology*, C.R.C. Paul and A.B. Smith, eds. (Oxford: Clarendon Press), pp. 69-84.
- Solzin, J. Chemotaxis von Seeigel-Spermien: Kinetische Messungen intrazellulärer Botenstoffe. 1-2-2003. Doktorarbeit im Fachbereich Biologie der Math.-Nat. Fakultät der Universität Köln.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Solzin, J., Helbig, A., Van, Q., Brown, J.E., Hildebrand, E., Weyand, I., and Kaupp, U.B. (2004). Revisiting the role of H^+ in chemotactic signaling of sperm. *J. Gen. Physiol.* **124**, 115-124.
- Staropoli, J.F. and Alon, U. (2000). Computerized analysis of chemotaxis at different stages of bacterial growth. *Biophys. J.* **78**, 513-519.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183-215.
- Stryer, L. (1996). *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag).
- Su, Y.-H. and Vacquier, V.D. (2002). A flagellar K^+ -dependent Na^+/Ca^{2+} exchanger keeps Ca^{2+} low in sea urchin spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6743-6748.

- Suzuki,N. (1995). Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zool. Sci.* **12**, 13-27.
- Suzuki,N., Nomura,K., Ohtake,H., and 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., and 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.
- Van, Q. Molekularbiologische Untersuchungen zur Signaltransduktion der Chemotaxis in Seeigelspermien. 17-9-2002. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Math.-Nat. Fakultät der Universität zu Köln.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Villanueva-Díaz,C., Arias-Martínez,J., Bustos-López,H., and Vadillo-Ortega,F. (1992). Novel model for study of human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril.* **58**, 392-395.
- Villanueva-Díaz,C., Vadillo-Ortega,F., Kably-Ambe,A., de los Angeles Diaz-Pérez,M., and Krivitzky,S.K. (1990). Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil. Steril.* **54**, 1180-1182.
- Wada,H. and Satoh,N. (1994). Phylogenetic relationships among extant classes of echinoderms, as inferred from sequences of 18S rDNA, coincide with relationships deduced from the fossile record. *J. Mol. Evol.* **38**, 41-49.
- Wadhams,G.H. and Armitage,J.P. (2004). Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nature* **5**, 1024-1037.
- Ward,C.R. and Kopf,G.S. (1993). Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.* **158**, 9-34.
- Ward,G.E., Brokaw,C.J., Garbers,D.L., and Vacquier,V.D. (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J. Cell Biol.* **101**, 2324-2329.
- Wood,C.D., Darszon,A., and Whitaker,M. (2003). Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *J. Cell Biol.* **161**, 89-101.
- Wood,C.D., Nishigaki,T., Furuta,T., Baba,S.A., and Darszon,A. (2005). Real-time analysis of the role of Ca^{2+} in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *J. Cell Biol.* **169**, 725-731.
- 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.
- Yu,X., Duan,K.-L., Shang,C.-F., Yu,H.-G., and Zhou,Z. (2004). Calcium through hyperpolarization-activated cation channels (I_h channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1051-1056.

Zhong,N., Beaumont,V., and Zucker,R.S. (2004). Calcium influx through HCN channels does not contribute to cAMP-enhanced transmission. *J. Neurophysiol.* 92, 644-647.

7 Anhang

7.1 Sequenz des zusammengesetzten CNG-Kanals aus *S. purpuratus*

Die Nummern der Sequenzen aus der Datenbank sind links neben der Sequenz angegeben. „Mismatches“ sind in rot dargestellt. Die Nummern und Sequenzen der verwendeten Primer für die Amplifizierung des Sonden-Fragments sind kursiv gedruckt. Die Nukleotide, die mit der DNA hybridisieren sind in Großbuchstaben und die, die nicht hybridisieren sind in Kleinbuchstaben gedruckt. Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

67052536	CGATGATCGAGTTCGACTGCAAGTAGTTCATCAAGAAATCTCCCTAATTCTACTTTTTCATTCAATGTTTCATTACACTA-	80
65874183		NCCCCGAATAGNNNN - 15
67052536	CATAATGAACATACAATGAAAACCAGGTATGTACTTAATAATTCTTGATTCATATATCATTTTAC-C TAAAA TGAATATT	159
		X.XXXX.XX.XXXXX
65874183	NGNCGATAGCANAGTTCACATTCTTTGATCTTGCAGGTATTTGGAGCAGGGTTTGGTGGTGGTGGACTT-ACGAAACTG	94
67052536	TTTTTCA AGTGAGTT----TTCTTTGATCTTGCAGGTATTTGGAGCAGGGTTTGGTGGTGGTGGAT TTCA ACGAAACTG	235
	XXXXXXXX.XXXX...XXXX.....X.XX.....	
65874183	AGAATAAACTACATGCGAGCCCCGTAAAGTGACCTTCTACCTAGATGTACTATCCATGCTCCCTCTTGATTTCCTCTACTT	174
58204439		NCAAATNNNGGGAGCAT TAT TCTCAC - 26
67052536	AGAATAAACTACATGCGAGCCCCGTAAAGTGACCTTCTACCTAGATGTACTATCCATGCTCCCTCTTGATTTCCTCTACTT	315
	XXXXXXXXXXXXXXXXX.XX.XXX.XX	
65874183	CAAAATCACCACAGTCTATGCCATTGTGAGGCTACCCAGACTATTAAGGTTTCATAGAGCATTAGAGTTCTTCGAACGTA	254
58204439	TTAAATCC CACANT-CTATGCCATTGTGAGGCTACCCAGACTAT CCATT TTTCATAGAGCATTAGAGTTCTTCGAACGTA	105
67052536	CAAAATCACCACAGTCTATGCCATTGTGAGGCTACCCAGACTATTAAGGTTTCATAGAGCATTAGAGTTCTTCGAACGTA	395
	XX.....X.XXXXXX.....XX.XX.....	
65874183	CAGAGACCATCACCAACTACCCCAACATCGTCGCGTCGTCACCTCATCATCTACATCATCGTCATCATCCATTGGAAT	334
58204439	CAGAC ATT ATCACCAACTACCCCAACATCGTCGCGTCGTCACCTCATCATCTACATCATCGTCATCATCCATTGGAAT	185
67052536	CAGAGACCATCACCAACTACCCCAACATCGTCGCGTCGTCACCTCATCATCTACATCATCGTCATCATCCATTGGAAT	475
	X.XX.....	
		HindIII
		5'-cccAagcTTATGATGGA
65874183	GCTTGTATCTACTTCTCAATATCCAAAGAAATTGGACTGGGCGAGGATGAATGGGTTTATGATAATAAATTTATGATGGA	414
58204439	GCTTGTATCTACTTCTCAATATCCAAAGAAATTGGACTGGGCGAGGATGAATGGGTTTATGATAATAAATTTATGATGGA	265
67052536	GCTTGTATCTACTTCTCAATATCCAAAGAAATTGGACTGGGCGAGGATGAATGGGTTTATGATAATAAATTTATGATGGA	555
		
	GTTACCAAACGGAAC-3' (#3845)	
65874183	GTTACCAAACGGAACAAAGATATCTACTGATTCACTAACCAGAAGGTATATCTACAGTCTGTATTGGTCAACATTAACAC	494
53957041		NNNGGGGAT TTAN NGGCATAGGCANANT TCTC ATCTAC GTCTGTATTGGTCA --CATTAACAC - 62
58204439	GTTACCAAACGGAACAAAGATATCTACTGATTCACTAACCAGAAGGTATATCTACAGTCTGTATTGGTCAACATTAACAC	345
67052536	GTTACCAAACGGAACAAAGATATCTACTGATTCACTAACCAGAAGGTATATCTACAGTCTGTATTGGTCAACATTAACAC	635
	XXXXXXXXX.XXXXXXXXXX.XX.X.XXXXXX.....XXXXXXXXX.X.XXXXX.....	
65874183	TGACTACCATTGGAGAGACACCGAAACCAGTGACGAACGCAGAGCATCTTTTCGTTGTAATTGATTTCTTGTGGGGTG	574
53957041	TGACTACCATTGGAGAGACACCGAAACCAGTGACGAACGCAGAGCATCTTTTCGTTGT CCT TGATTTCTTGTGGGGTG	142
58204439	TGACTACCATTGGAGAGACACCGAAACCAGTGACGAACGCAGAGCATCTTTTCGTTGTAATTGATTTCTTGTGGGGTG	425
67052536	TGACTACCATTGGAGAGACACCGAAACCAGTGACGAACGCAGAGCATCTTTTCGTTGTAATTGATTTCTTGTGGGGTG	715
	XX.....	
65874183	CTTATCTTCGCCACCATTGTGCGTAATGTAGGCTCTATGATAAGCCACATGAATGCGAGTAAAGCAGACTTTCAGAACCG	654
53957041	CTTATCTTCGCCACCATTGTGCGTAATGTAGGCTCTATGATAAGCCACATGAATGCGAGTAAAGCAGACTTTCAGAACCG	222
58204439	CTTATCTTCGCCACCATTGTGCGTAATGTAGGCTCTATGATAAGCCACATGAATGCGAGTAAAGCAGACTTTCAGAACCG	505
67052536	CTTATCTTCGCCACCATTGTGCGTAATGTAGGCTCTATGATAAGCCACATGAATGCGAGTAAAGCAGACTTTCAGAACCG	795
		
65874183	TATTGATGGTGTGAAGCACTACATGAGCCTGCGTAAGGTCAGCAAAGAACTCGAACAAGAATCATCAATGGTTTGACT	734
53957041	TATTGATGGTGTGAAGCACTACATGAGCCTGCGTAAGGTCAGCAAAGAACTCGAACAAGAATCATCAATGGTTTGACT	302
58204439	TATTGATGGTGTGAAGCACTACATGAGCCTGCGTAAGGTCAGCAAAGAACTCGAACAAGAATCATCAATGGTTTGACT	585
67052536	TATTGATGGTGTGAAG	811
		

65874183	ATATATGGTCCAATAAAAAAGACCCTCGACGAAGAAGCAATACTCAACACTTTACCCGAGAAACTGCGGGCTGAAATTGCA	- 814
53957041	ATATATGGTCCAATAAAAAAGACCCTCGACGAAGAAGCAATACTCAACACTTTACCCGAGAAACTGCGGGCTGAAATTGCA	- 382
58204439	ATATATGGTCCAATAAAAAAGACCCTCGACGAAGAAGCAATACTCAACACTTTACCCGAGAAACTGCGGGCTGAAATTGCA	- 665
.....		
3'-GCTTGGTCCTGACGACCACCTTaAgCg-5' (#3846)		
65874183	ATCCACGTTACATGGACACTTTAAGACGAGTTACAATCTTTTCTGATTGCGAACCAGGACTGCTGGTGGAACTGGTCCT	- 894
53957041	ATCCACGTTACATGGACACTTTAAGACGAGTTACAATCTTTTCTGATTGCGAACCAGGACTGCTGGTGGAACTGGTCCT	- 462
58204439	ATCCACGTTACATGGACACTTTAAGACGAGTTACAATCTTTTCTGATTGCGAACCAGGACTGCTGGTGGAACTGGTCCT	- 745
.....		
65874183	NGAACTGAAACCTCANGTGTTTAGTCCGGGAGATTTTCGTTTGTTCGGAAGGGTGACATCGGACGAGAGATGTACATCGTGA	- 974
53957041	GAAGCTGAAACCTCAGGTGTTTAGTCCGGGAGATTTTCGTTTGTTCGGAAGGGTGACATCGGACGAGAGATGTACATCGTGA	- 542
58204439	GAAGCTGAAACCTCAGGTGTTTAGTCCGGGAGATTTTCGTTTGTTCGGAAGGGTGACATCGGACGAGAGATGTACATCGTGA	- 825
XX.....X.....		
65874183	AGCAGGGTAAACTTCANGTGCGGTGAGGATGGTAAGACTGTTTATGCTACTTTAAGTGACGGCAGTTACTTCGGTGAG	- 1054
53957041	AGCAGGGTAAACTTCAGGTGCGGTGAGGATGGTAAGACTGTTTATGCTACTTTAAGTGACGGCAGTTACTTCGGTGAG	- 622
58204439	AGCANGGTAAACTTCAGGTGCGGTGAGGATGGTAAGACTGTTTATGCTACTTTAAGTGACGGCAGTTACTTCGGTGAG	- 905
....X.....X.....		
65874183	ATCAGCATTTCTTAACGTACCTGGTAGCTTATCANGTANCCGTCCAACGTGCGAAGTGTTCGTTATTTCGAAGT	- 1134
53957041	ATCAGCATTTCTTAACGTACCTGGTAGCTTATCAGGTAACCGTCGAAGTCCCAACGTACGAAGTGTTCGCTATTTCGGACGT	- 702
58204439	ATCAGCATTTCTTAACGTACCTGGTAGCTTATCAGGTAACCGTCGAAGTCCCAACGTACGAANGTTGGCTATTTCGGACGGT	- 985
.....X...X...X.....XXX.XXXXXXXXXXXXX..		
65874183	GGTCTGTCTATCAAAGGACGATCTTCTAGATGCCCTCAA-G-AGTATCTTGAACGAGGGTTATTCTAAAGGAAAAAGGG	- 1212
53957041	GTCTGTCTATCNAAGGACGATCTTCTAGATGCCCTCAA-GGAGTATCTTGAAGCGAGGGTTATTCTAGAGGAGAGAGGG	- 781
58204439	TCTGTCTATAAAGGAAG---ATCTTCTAGATGCCNTCAAGG-AGTATCTGAAGC-GAGGGTTATTCTAGA-GGAAAAGGCG	- 1059
XX.X.X.X...XXXX.X.XXX.....X...X.X.....XXX.XXX.....XXXXXX...X.XX.X.		
65874183	GGTACTACCTATGGAAGAA--GGTTTGATCA	- 1241
53957041	CGTACTATCTTAATGAAAGATGGTTTGAT-CGATGAGGAAGCCGCTAAGCGAGGTGGACGCACCGCAGAGCAAGTCGAAC	- 860
58204439	--TACTATCTAATGAAAT--G-TTTGATCAAATAAGAACCCTANCGAGGGGACCCGCAACAAGCAAAATTTGAAAA	- 1134
XX....X...XXXXX.X.XXX.X.....XX		

7.2 Weitere in dieser Arbeit verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Hybridisierungsbereich
#9001 (T3-Primer)	AATTAACCTCACTAAAGGG	Polylinker pBluescript SK ⁻
#9002 (T7-Primer)	TAATACGACTCACTATAGGG	Polylinker pBluescript SK ⁻

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-1) des Forschungszentrum Jülich angefertigt. Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

- Prof. Dr. U.B. Kaupp danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft.
- Dr. M. Böhmer danke ich für sein außerordentliches Engagement, seine freundschaftliche Unterstützung und Betreuung. Ohne sein Mitwirken wäre diese Arbeit niemals so gelungen. Außerdem danke ich ihm für die Durchsicht meiner Arbeit.
- Dr. W. Bönigk danke ich für seine Betreuung in allen Dingen der Molekularbiologie.
- Dr. I. Weyand danke ich für seine hilfreiche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während meiner Arbeit.
- Frau A. Eckert danke ich für die verwaltungstechnische Betreuung.
- D. Porz und R. Esser danke ich für ihre freundliche Hilfe bei technischen und organisatorischen Problemen.

Frau Prof. Dr. S.I. Korsching möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachterin der Universität zu Köln danken.

Herrn Prof. Dr. U.I. Flügge möchte ich für die Übernahme des Vorsitzes in meiner Disputation danken.

Ein besonderer und herzlicher Dank geht an meine Familie, die mich immer unterstützt hat und mir in jeder Lebenslage Sicherheit und Rückhalt gibt.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschliesslich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.B. Kaupp betreut worden.

Köln, September 2005

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Solzin, J., Helbig, A., Van, Q., Brown, J.E., Hildebrand, E., Weyand, I., and Kaupp, U.B. (2004). Revisiting the role of H^+ in chemotactic signaling of sperm. *J. Gen. Physiol.* 124, 115-124.

Böhmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto, M., Hoshi, M., Hildebrand, E., Kaupp, U.B. (2005). Ca^{2+} spikes in the flagellum control chemotactic behaviour of sperm. *EMBO J.* 24, 2741-2752.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4190
November 2005
ISSN 0944-2952